Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H.A. Hirsch

# Über den Einfluß von Betamethason und Tamoxifen auf das 3ß-ol-Dehydrogenase - delta 5 - delta 4 - Isomerase-System der menschlichen Plazenta

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von
VERA GRUBER
aus Stuttgart

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536517_0018

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H.A. Hirsch

# Über den Einfluß von Betamethason und Tamoxifen auf das 3ß-ol-Dehydrogenase - delta 5 - delta 4 - Isomerase-System der menschlichen Plazenta

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von
VERA GRUBER
aus Stuttgart

1984

| | |
|---|---|
| Dekan: | Professor Dr. H. D. Waller |
| 1. Berichterstatter: | Professor Dr. A. E. Schindler |
| 2. Berichterstatter: | Professor Dr. V. Unbehaun |

INHALTSVERZEICHNIS


| I | EINLEITUNG | Seite |
|---|---|---|
| 1.1. | Steroidstoffwechsel | 1 |
| 1.2. | Betamethason | 13 |
| 1.3. | Tamoxifen | 18 |
| II | UNTERSUCHUNGEN | |
| 2.1. | Grundzüge der Untersuchungen | 26 |
| 2.2. | Material | 26 |
| 2.2.1. | Lösungsmittel und Pufferlösung | 26 |
| 2.2.2. | Kristalline Steroide | 26 |
| 2.2.3. | Radioaktive Steroide | 27 |
| 2.2.4. | Radioaktivitätsmeßgeräte | 27 |
| 2.2.5. | Dünnschichtplatten | 27 |
| 2.2.6. | Pharmaka | 28 |
| 2.2.7. | Plazenta | 28 |
| 2.3. | Durchführung der Untersuchungen | 33 |
| 2.3.1. | Vorbereitung der Versuche | 33 |
| 2.3.2. | Präparation und Inkubation des Plazentagewebes | 33 |
| 2.3.3. | Extraktion der Steroide | 35 |
| 2.3.4. | Dünnschichtchromatographie | 35 |
| 2.3.5. | Acetylierung | 37 |
| 2.3.6. | Kristallisation | 37 |
| 2.3.7. | Berechnung der Umwandlungsraten | 38 |
| 2.3.8. | Proteinbestimmung | 39 |
| III | ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN | |
| 3.1. | $^{14}C/^{3}H$-Ratios der Versuche 1 - 11 | 41 |
| 3.2. | Umwandlungsraten der Versuche 1 - 11 | 47 |
| 3.3. | Ergebnisse der Proteinbestimmung | 50 |

IV STATISTIK

4.1. Erläuterungen 52
4.2. Tabellen 52
4.3. Ergebnisse der statistischen Auswertung 54

V DISKUSSION 55

VI ZUSSAMENFASSUNG 61

VII LITERATURVERZEICHNIS 63

DANK

LEBENSLAUF

# I. EINLEITUNG

## 1.1. Steroidstoffwechsel

Als der deutsche Gynäkologe Ludwig Fraenkel im Jahre 1903 an Kaninchen nachwies, daß nach Entfernung der Corpora lutea die Einnistung einer befruchteten Eizelle nicht möglich ist beziehungsweise eine bereits bestehende Schwangerschaft dadurch beendet wird, und er dies durch den Wegfall der inneren Sekretion der Gelbkörper erklärte, war damit der erste Schritt in der Erforschung des Steroidstoffwechsels getan.
1929 gelang es dem Anatom G.W.Corner und dem Gynäkologen W.M.Allen, aus Gelbkörpern von Schlachttieren einen Wirkstoff zu isolieren, der am Endometrium von Kaninchen die für die Corpus-luteum-Phase typischen Veränderungen hervorrief und bei nach der Befruchtung kastrierten Tieren die Schwangerschaft aufrechterhielt; diese Substanz nannten sie "Progestin".
1934 gelang unter anderem auch einer deutschen Forschergruppe um Butenandt, Fernholz und Slotta die Strukturaufklärung und Synthese dieser Substanz, die schließlich im Jahre 1935 auf Vorschlag der beteiligten Gruppen den Namen "Progesteron" erhielt (Tausk, 133).
Bereits 4 Jahre später konnte Mamoli (85) Pregnenolon als Vorstufe von Progesteron nachweisen. Hechter (51) gelang es 1951, nach Perfusion von Nebennierenrindengewebe mit Pregnenolon die Metaboliten Progesteron, 17-OH-Progesteron und Corticosteron zu identifizieren.
In den Jahren danach wurde die zentrale Bedeutung des Progesterons im Stoffwechsel der Steroidhormone erkannt, und die Erforschung der Steroide und ihrer Metabolisierung wurde zu einem wichtigen Bestandteil der wissenschaftlichen Arbeit. Eine wesentliche Voraussetzung für die rapide Weiterentwicklung auf diesem Gebiet war die ständige Verbesserung der Untersuchungsmethoden, an der Siiteri (126, 127) und Schindler (115) maßgeblich beteiligt waren;

vor allem durch die Einführung der Doppelisotopenmethode (127) gelang eine bessere Identifizierung der Steroide.

Pregnenolon und Progesteron gehören zu den $C_{21}$-Steroiden und weisen als Grundstruktur das Pregnangerüst auf.

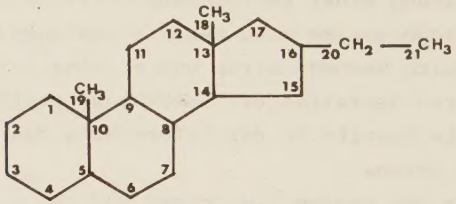
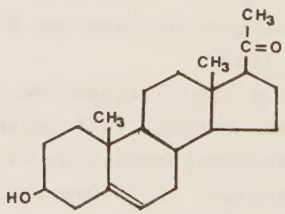
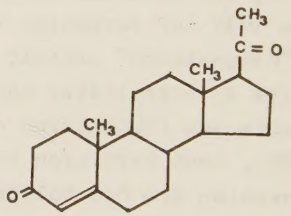


Abb.1: Pregnan-Grundgerüst.

Pregnenolon ist durch eine Doppelbindung zwischen $C_5$ und $C_6$ und eine β-ständige OH-Gruppe an $C_3$ gekennzeichnet, während bei Progesteron die 3-β-OH-Gruppe zur Ketogruppe dehydriert und die Doppelbindung $C_5$-$C_6$ nach $C_4$-$C_5$ verlagert ist.



Pregnenolon
(3β-hydroxypregn-5-en-20-one)



Progesteron
(Pregn-4-ene-3,20-dione)

Abb.2: Strukturformeln von Pregnenolon und Progesteron.

Für die Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron ist das 3ß-ol-Dehydrogenase-$\Delta^5$-$\Delta^4$-Isomerase-Enzymsystem verantwortlich, das in allen Steroidhormone produzierenden Geweben vorhanden ist (Samuels, 110).

Der Nachweis der 3ß-ol-Dehydrogenase gelang u.a. Baillie et al. 1965 (7), Singh et al. 1969 (128) und Townsend et al. 1970 (139); Baillie beobachtete dabei eine ausgeprägte Aktivität der Dehydrogenase im Syncytiotrophoblasten, was durch die Untersuchungen von Solomon (131) und Diczfalusy (25) bestätigt wird.

Aufgrund neuerer Untersuchungen von Cowan et al. 1974 (21) erscheint es möglich, daß das 3ß-ol-DHG-$\Delta^5$-$\Delta^4$-Isomerase-System nicht nur im glatten endoplasmatischen Retikulum, sondern auch in den Mitochondrien lokalisiert ist, da bei der Untersuchung von submitochondrialen Membranfraktionen hauptsächlich an der äußeren Mitochondrienmembran eine Enzymaktivität gefunden wurde, was jedoch auch durch Kontamination bei der Herstellung der Fraktionen zustandegekommen sein könnte (21).

Matsumoto et al. (87) wiesen 1969 eine 3ß-ol-Dehydrogenase in der Plazenta von Kaninchen nach; sie stellten dabei fest, daß die Aktivität des Enzyms in der Plazenta nur etwa 1/100 des Enzyms aus dem Ovar beträgt. Shinada (123) wies 1975 auf das reichliche Vorhandensein des Enzymsystems im Corpus luteum hin.

Koide et al. (67) gelang es, die beiden Enzyme durch fraktioniertes Zentrifugieren zu trennen. Dabei ergab sich als pH-Optimum für die 3ß-ol-Dehydrogenase ein pH von 10 - 10,5; für die $\Delta^5$-$\Delta^4$-Isomerase lag dieser Wert bei pH 7,0; wichtig hierbei ist, daß die 3ß-ol-DHG bei pH 7,0 keine Aktivität mehr zeigt. Bei gemeinsamer Betrachtung der beiden Enzyme fanden Seifart et al. 1968 (120) ein Maximum der physiologischen Progesteronsynthese im Corpus luteum bei pH 7,3 - 7,4.

Gupta et al. (43) kamen zu dem Ergebnis, daß die 3ß-ol-DHG eine größere Substrataffinität besitzt und leichter

zu beeinflussen ist als die $\Delta^5$-$\Delta^4$-Isomerase.
Inwieweit die Aktivität der Enzyme von der Regulation durch übergeordnete Zentren abhängt, ist bis jetzt noch nicht sicher geklärt. Wiener et al. 1971 (145) konnten in ihren Untersuchungen einen Einfluß der Hypophyse auf die Progesteronsyntheserate nicht nachweisen, was durch die Untersuchungen von Hohlstein (56) bestätigt wird, wonach LHRH diesbezüglich keine Wirkung zeigte. Jaffe (58) dagegen beschrieb eine spezifische Stimulation durch Hormone des Hypophysenvorderlappens für die Cholesterolseitenkettenabspaltung in Gonaden und Nebennieren. Hagemenas (45) lehnt eine vom Hypophysenvorderlappen gesteuerte Beeinflussung der Progesteronsyntheserate in der Plazenta ab.

Abgesehen von einer möglichen Regulation der Enzymaktivität durch übergeordnete Zentren ist auch die Beeinflussung durch Stoffwechselprodukte (hauptsächlich im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus) von Bedeutung.
1967 wiesen Dell'Acqua et al. (23) auf einen relativen Mangel an 3ß-ol-DHG beim Feten hin. Bald darauf wurde dies durch Teller, W.M. (137) bestätigt, der in seinen Untersuchungen an der fetalen Nebenniere eine Hemmung der 3ß-ol-DHG durch plazentare Hormone (z.B. Progesteron) nachwies; sobald jedoch nach der Geburt die Bremswirkung der plazentaren Hormone wegfällt, setzt die eigene Steroidproduktion des Neugeborenen ein.
Das durch den Enzymmangel anfallende fetale $\Delta^5$-Pregnenolon, das Conrad (20) in hoher Konzentration im Nabelschnurblut fand, wird hydroxyliert, zu Dehydroepiandrosteron abgebaut und gleichzeitig mit Schwefelsäure konjugiert; freies DHEA, DHEA-Sulfat (DHEAS) und 16$\alpha$-OH-DHEAS gelangen zurück in die Plazenta und werden dort als Vorstufen zur Östrogensynthese verwendet (Teller, 137).
Wiener et al. (144) kamen zu dem Ergebnis, daß eine derartige Hemmung, die nichtkompetitiver Art zu sein scheint, nur durch Stoffe möglich ist, die eine ganz bestimmte

chemische Konfiguration aufweisen, nämlich am $C_{20}$-Atom eine oxygene Komponente und eine $\Delta^4$-3-Ketofunktion, so z.B. Progesteron und 20α-OH-Progesteron. 17α-OH-Progesteron und 16α-OH-Progesteron, die beide eine zusätzliche Hydroxygruppe besitzen, übten dagegen eine um 20% geringere bzw. überhaupt keine Hemmwirkung aus. Dies läßt den Schluß zu, daß für die Bindung des Hemmstoffs an das Enzym die OH-Komponente am $C_{20}$-Atom verantwortlich ist und daß die Einführung zusätzlicher oxygener Gruppen an benachbarten Atomen, z.B. $C_{16}$ und $C_{17}$, diese Bindung durch Reduktion der Hemmwirkung beeinflußt.
Untersucht man die Hemmwirkung von 20α-OH-Progesteron in Abhängigkeit vom Alter der Plazenta (Wiener, 145), so zeigten in-vitro-Versuche keine Unterschiede; bei in-vivo-Bedingungen dagegen steht bei höherem Alter der Plazenta mehr Hemmstoff zur Verfügung. Außerdem konnten Wiener et al. (144) nachweisen, daß die Synthese von 20α-OH-Progesteron durch Östriol und seine Isomeren unterdrückt wird.

Eine Abhängigkeit vom Alter der Plazenta besteht auch für die Reaktionsgeschwindigkeit der 3β-ol-DHG; so ergaben sich bei Untersuchungen an Plazenten von Spontanaborten (22.Woche) im Vergleich zu termingerechten Plazenten (Sectio) sowohl eine deutliche Verlangsamung der Umsatzgeschwindigkeit von Pregnenolon durch die 3β-ol-DHG als auch eine erhöhte 20α-OH-Progesteronsynthese.

Wie eingangs schon erwähnt, spielt der Stoffwechselschritt von Pregnenolon zu Progesteron eine wichtige Rolle im Steroidmetabolismus, da Progesteron die Ausgangssubstanz für zahlreiche weitere Steroide darstellt, wie der folgende Überblick zeigt:

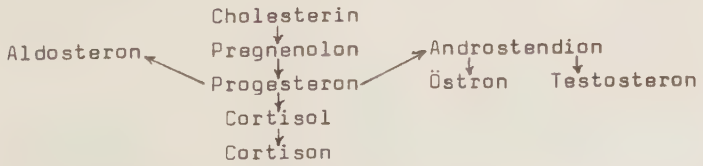



Abb.3: Steroidstoffwechsel - Überblick.

Die Synthese von Progesteron findet in mehreren Organen statt; in den ersten 4 Wochen der Schwangerschaft wird es hauptsächlich im Corpus luteum gebildet, während im Anschluß daran die Plazenta eine zentrale Bedeutung in der Progesteronbildung erlangt (Solomon, 131). Nach Hellig (53) beträgt die produzierte Progesteronmenge mindestens 250 mg/Tag; Tausk (133) und Zander (153) geben Werte zwischen 190 und 300 mg/Tag an.
Der Nachweis der Plazenta als wichtigstem Ort der Progesteronsynthese war Gegenstand mehrerer Arbeiten. Durch Untersuchungen an Patientinnen mit Ovarektomie, M.Addison und Bauchhöhlenschwangerschaft konnten Hellig (53) und Zander (153) Ovarien, Nebenniere und Fet als wesentliche Progesteronsyntheseorte ausschließen. Harbert (46) und Zander (150, 152) konnten durch Messungen im Nabelschnurblut einen höheren Progesterongehalt in der Nabelvene als in der Nabelarterie bzw. im mütterlichen Blut nachweisen, was durch die Untersuchungen von Dell'Acqua et al. 1967 (23) bestätigt wird. Demzufolge kann man annehmen, daß in der Plazenta Progesteron gebildet wird und von dort zum Feten gelangt, wo es weiter verarbeitet wird.
Auch Palmer et al. 1966 (100) kamen zu dem Ergebnis, daß Pregnenolon in der Plazenta, nicht jedoch im Feten, zu Progesteron umgewandelt wird, wobei nicht ausgeschlossen ist, daß Pregnenolon auch ohne Metabolisierung direkt auf den Feten übergeht.
Schindler (113) dagegen wies eine geringe Progesteronsynthese beim Feten nach, wobei diese jedoch lediglich im Hodengewebe zu finden ist (117). Im Fruchtwasser, dessen Steroidgehalt aus fetaler Urinausscheidung resultiert, konnte Schindler (114) ebenso nur minimale Menge von Progesteron isolieren, die im Bereich von etwa 1/10 der Nabelvenenkonzentration lagen. Zurückzuführen ist dies auf den bereits oben erwähnten relativen Mangel des Feten an $\Delta^5$-3ß-ol-Dehydrogenase (Dell'Acqua, 23). Nach Berichten von Lauritzen et al. (73) scheiden Neugeborene in

den ersten 3 Lebenstagen abnehmende Mengen von Progesteron, 20α- und 20β-Dihydroxyprogesteron aus, die noch aus der Plazenta stammen und dementsprechend nach der Geburt absinken. Lurie (83) wies 2 Stunden nach der Plazentageburt nur noch minimale Progesteronkonzentrationen im peripheren Blut des Neugeborenen nach.
In Untersuchungen an Schwangerschaften mit reifen anenzephalen Feten erwies sich ebenfalls die Plazenta als Ort der Progesteronsynthese (Hellig, 53); durch Ausfall der fetalen Nebenniere und damit durch Fehlen des fetalen Anteils des zur Progesteronsynthese benötigten Cholesterols war die Pregnandiolausscheidung dabei um etwa 10% geringer, da der Plazenta nur das mütterliche Plasmacholesterol zur Verfügung stand. Die plazentare Progesteronproduktion scheint demnach nicht von der Anwesenheit des Feten abhängig zu sein. Auch ist sie nicht auf die Zufuhr von aus dem Blut stammenden Vorstufen der extraplazentaren endokrinen Organe (Ovarien, NNR) angewiesen, wie Gabbe et al. (36) zeigen konnten; sie fanden dabei eine plazentare Umwandlung von $^{3}$H-Pregnenolon in Progesteron zu 85%.
Als genauer lokalisierten Syntheseort für Progesteron in der Plazenta geben Baillie (7), Solomon (131) und Diczfalusy (25), wie schon oben ausgeführt, den Syncytiotrophoblasten an.

Die Synthese des Progesterons beginnt beim Acetat-Pool und verläuft über mehrere Zwischenprodukte (s. Schema auf der nachfolgenden Seite), wobei nicht alle Stoffwechselschritte von der Plazenta durchgeführt werden können.

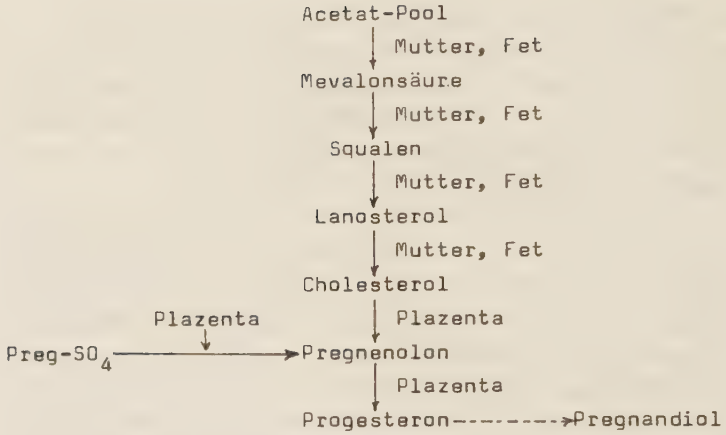



Abb.4: Progesteronsynthese.

Bereits 1945 konnte Bloch (13) in vivo eine Umwandlung von Cholesterol in Pregnandiol nachweisen, wobei er annahm, daß Progesteron als Zwischenprodukt auf diesem Syntheseweg fungiere. Van Leusden et al. 1973 (75) kamen zu dem Ergebnis, daß bei Perfusion von Plazenten mit $^{14}C$-markiertem Na-Acetat keine Vorstufen des Pregnenolons, z.B. Squalen, Lanosterol oder Cholesterol, gefunden werden. Dies bedeutet, daß die Plazenta zur Progesteronsynthese auf das Angebot von Cholesterol angewiesen ist. Telegdy 1973 (135) und Hellig 1970 (53) bestätigen diese Ansicht, wobei nach Hellig bei einer normalen Schwangerschaft etwa 90% des zur Progesteronsynthese benötigten Cholesterols aus dem mütterlichen Blut stammen; die restlichen 10% werden von der fetalen Nebenniere bereitgestellt.
Diczfalusy (28) und Mathur (86) wiesen auch beim Feten eine intensive Cholesterolsynthese nach; Mathur gibt dabei an, daß von zugeführtem markiertem Acetat etwa 1% in Cholesterol umgewandelt wird. Ein Teil des Cholesterols wird vom Feten an die Plazenta abgegeben. Etwa 80% des fetalen Plasma- bzw. Lebercholesterols werden vermutlich

vom Feten selbst aus kleinmolekularen Bestandteilen, z.B. Acetat, gebildet, die restlichen 20% stammen von der Mutter.
Van Lousden (75) weist darauf hin, daß die Plazenta nach der 20.Schwangerschaftswoche möglicherweise selbst in der Lage ist, in begrenztem Umfang Squalen, Lanosterol und Cholesterol zu bilden.
Baird et al. 1973 (8) sind der Meinung, daß das plazentare Progesteron nur teilweise aus Cholesterol gebildet wird; bei Perfusionsversuchen mit markiertem Cholesterol ergab sich nur zu 25% eine Umwandlung in Progesteron. Vermutlich werden noch andere Vorstufen, beispielsweise Cholesterolester, Pregnenolon oder Pregnenolonsulfat, zur Synthese herangezogen.

Die weitere Verstoffwechselung des Progesterons geht in vielfältigster Weise vor sich.
Vom Feten wird das plazentar gebildete Progesteron vor allem in der Leber und in der Nebennierenrinde weiterverarbeitet (Younglai, 149). In der fetalen Nebenniere wird es zu 16α-OH-Progesteron (Bird, 12; Zander, 151), 17α-OH-Progesteron (Bird, 12; Diczfalusy, 27; Zander, 151), Corticosteron (Bird, 12), Hydrocortison (Bird, 12) und Cortisol (Diczfalusy, 27) umgebaut. In der Leber des Feten findet hauptsächlich eine 20α-Hydroxylierung statt (Zander, 151; Palmer, 101; Bird, 12).
Axelrod et al. (4) wiesen die Umwandlung von Progesteron in 17α-OH-Progesteron im Ovar nach.
Von einer Verstoffwechselung zu Östriol unter Umgehung der plazentaren Aromatisierung berichten Taylor et al. 1974 (134).
Die Umwandlung von Progesteron über 17α-OH-Progesteron in Androstendion bzw. Testosteron wurde von Schindler (113) beschrieben, ebenso wie die Umwandlung von Androstendion in Östron in der Plazenta (Schindler, 118).

Auch weist Schindler (114) auf die ausgeprägte Fähigkeit des Feten zur 16α-Hydroxylierung hin, die nach der Geburt fast vollständig verloren geht. Diese $C_{16}$-Hydroxylierung ist vor allem für die Synthese von Östriol, dessen Hauptvorstufen diese Hydroxylgruppe aufweisen, von Bedeutung.

Die Elimination des Progesterons aus dem Steroidstoffwechsel erfolgt durch Inaktivierung in der Leber, und zwar durch Einführen von Wasserstoffatomen in das Molekül (Tausk, 133). Die dabei entstehenden Isomeren, zusammenfassend als Pregnandiol bezeichnet, werden an Glukuronsäure gekoppelt und mit dem Urin ausgeschieden. Im allgemeinen versteht man unter Pregnandiol das an Glukuronsäure gekoppelte 3α-5β-20α-Pregnandiol. Im Urin betragen die Werte während der ersten Zyklushälfte etwa 1 mg/24h, nach der Ovulation 2 - 8 mg/24h, in den letzten 3 Monaten der Schwangerschaft 50, 60 und mehr mg pro 24h (Tausk, 133). Nach Hellig (53) liegen die Werte maximal bei 40 mg/24h.

Während der Schwangerschaft ist die gegenseitige Abhängigkeit von Fet und Plazenta in Bezug auf die endokrinologischen Funktionen von großer Wichtigkeit, was Diczfalusy 1964 (26) zu der Bezeichnung "feto-plazentare Einheit" veranlaßte.
Sowohl bei der Plazenta als auch beim Feten sind die zur Steroidsynthese notwendigen Enzyme nur teilweise vorhanden; so ist die Plazenta nicht in der Lage, Acetat in Cholesterol umzuwandeln, eine 16α-Hydroxylierung durchzuführen, adrenocorticale Steroide zu bilden oder eine Seitenkettenabspaltung am Steroidgerüst durchzuführen (Sobrevilla, 129; Singh, 128). Der Fet dagegen verfügt über die in der Plazenta fehlenden Enzyme, was im umgekehrten Fall ebenso zutrifft (Diczfalusy, 28). Zander (151) hat bereits 1963 einen plazento-fetalen Kreislauf für die Gestagene beschrieben: das in der Plazenta ge-

bildete Progesteron gelangt mit dem Blut zum Feten, wird dort zu 20α-OH-Progesteron umgewandelt, das zur Plazenta transportiert und dort schließlich wieder zu Progesteron oxidiert wird. Palmer (101) bezeichnete dies als Interconversion.

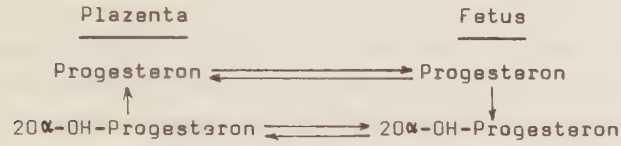



Abb.5: Schema des plazento-fetalen Kreislaufs von Progesteron nach Solomon (130).

Im übrigen hat die weitere Verstoffwechselung des Progesterons innerhalb der Plazenta keine große Bedeutung (Palmer, 101).
Eine Umwandlung von Progesteron in 20α-OH-Progesteron findet in der Plazenta so gut wie nicht statt, obwohl das entsprechende Enzymsystem vorhanden wäre (Zander, 151). Die feto-plazentare Einheit ist auch für die Bereitstellung von Cholesterol und die Östriolsynthese von großer Bedeutung (Diczfalusy, 28; Mathur, 86; Schindler, 114): der Fet bildet bei der Östriolsynthese aus plazentarem Progesteron die $C_{19}$-Steroide Androstendion und Testosteron (Schindler, 113) und führt die $C_{16}$-Hydroxylierung durch, während die Plazenta Androstendion in Östron umwandelt (Schindler, 118).
Daß Progesteron eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung einer Schwangerschaft spielt, war, wie anfangs kurz erwähnt, schon seinen Entdeckern aufgefallen. Gutermann 1953 (44) weist auf die enge Beziehung zwischen niedrigem Pregnandiolspiegel im Urin von Schwangeren und erhöhtem Abortrisiko hin; eine deutliche Senkung der Abortrate kann durch Gabe von Progesteron erreicht werden (Jakobsen, 57; Gutermann, 44). Auch Diczfalusy (25) hebt in seinen Untersuchungen die Bedeutung des Progesterons

für die Schwangerschaft hervor.

Nach diesem kurzen Überblick über den Steroidstoffwechsel während der Schwangerschaft erscheint es verständlich, daß gerade dem Stoffwechselschritt Pregnenolon zu Progesteron und dem dazugehörigen Enzymsystem eine wichtige Stellung zukommt. Demzufolge war dieser Stoffwechselschritt und vor allem auch seine medikamentöse Beeinflussung in letzter Zeit häufig Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen (Bader, 6; Hohlstein, 56; Röhner, 106; Sacher, 109; Teller, 136; Weimer, 143).

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluß von Betamethason und Tamoxifen auf die Umwandlung von Pregnenolon zu Progesteron in der menschlichen Plazenta untersucht.

## 1.2. Betamethason (Celestan$^R$)

Betamethason gehört zu den synthetischen $C_{21}$-Steroiden mit glucocorticoider Wirkung und leitet sich vom Cortisol ab. Dementsprechend weist es die für die glucocorticoide Wirkung verantwortlichen Strukturmerkmale auf: eine Ketogruppe an $C_3$, eine Doppelbindung zwischen $C_4$ und $C_5$, eine Ketolseitenkette an $C_{17}$, eine Hydroxylgruppe an $C_{11}$ und eine Hydroxylgruppe in $\alpha$-Stellung an $C_{17}$.

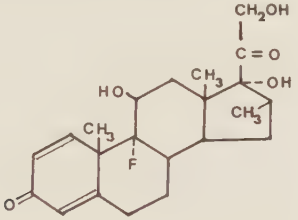



Abb.6: Strukturformel von Betamethason (= 9$\alpha$-Fluor-16ß-methyl-prednisolon); Molekulargewicht: 392,47.

Im Vergleich mit Cortisol ist die Glucocorticoidwirkung bei Betamethason etwa 30mal so stark, die mineralocorticoide Wirkung dagegen ist gleich null. Die metabolische Umwandlung läuft außerdem bei Betamethason etwas langsamer ab; so beträgt die mittlere Plasmahalbwertzeit bei Betamethason etwa 200 min., bei Cortisol dagegen nur ca. 110 min. Nach Inaktivierung in der Leber werden rund 99% als Glukuronide über die Nieren ausgeschieden, etwa 1% erscheint als freies Cortisol im Urin.
Da Betamethason von allen therapeutisch verwendeten Corticoiden die stärkste antiphlogistische und antiallergische Wirkung pro mg besitzt, wird es bevorzugt bei Corticoidindikationen, bei denen ein schneller Wirkungseintritt und eine intensive Wirksamkeit erforderlich sind, angewendet. Außerdem hat Betamethason in letzter Zeit eine wichtige Bedeutung bei der Prophylaxe und Therapie des Hyaline-Membranen-Syndroms bei Frühgeborenen erlangt.

De Lemos et al. 1970 (22), Kotas et al. 1971 (70) und Motoyama et al. 1971 (93) konnten erstmals durch Untersuchungen an Lämmer- und Kaninchenfeten zeigen, daß durch intrauterine bzw. intraamniale Glucocorticoidapplikation die Lungenreifung beschleunigt und die postnatale Überlebenszeit verlängert werden kann. 1972 erprobte dann Liggins (77) die pränatale Applikation von Betamethason zur Verhütung des Membransyndroms bei prämaturen Kindern, wobei die Betamethason-Prophylaxe generell bis Ende der 37. Schwangerschaftswoche vorgenommen wurde. Bei Frühgeborenen nach einer Schwangerschaftsdauer von weniger als 32 Wochen ergab sich hierbei eine statistisch signifikante Verringerung des Membransyndroms; bei einer Schwangerschaftsdauer von mehr als 32 Wochen war die Häufigkeit des Membransyndroms ebenfalls reduziert, jedoch weniger deutlich.
Farrell et al. (30) konnten 1973 nachweisen, daß diesem Effekt eine Enzyminduktion zugrundeliegt. Durch Erhöhung der Aktivität der Phosphorylcholin-Glyzerid-Transferase kommt es zu beschleunigter Synthese des Anti-Atelektase-Faktors (= Surfactant), einer oberflächenaktiven Substanz, die als extrazelluläre Alveolarauskleidung durch Senkung der Oberflächenspannung einen exspiratorischen Kollaps der Alveolen verhindert; das Surfactant ist ein Gemisch von Phospholipiden, vor allem Lecithin und Sphingomyelin (Abrams, 1; Adams, 2; Gluck, 39; Nelson, 96), die in spezifischen Alveolarzellen, den Pneumocyten Typ II, synthetisiert und in den Alveolarraum sezerniert werden (Hatasa und Nakamura, 50; Williams et al., 146).

Die Ergebnisse von Liggins (77) wurden bald darauf von Siebert und Meitinger (125) und Mund-Hoym et al. (95) bestätigt. Siebert und Meitinger geben dabei aufgrund statistischer Erhebungen eine perinatale Mortalität der am Membransyndrom verstorbenen Frühgeborenen von 17% ohne Prophylaxe und von 8,4% mit Betamethason-Prophylaxe an.

Entscheidend für die Prophylaxe des Membransyndroms mit Betamethason scheint u.a. der Zeitpunkt der Applikation zu sein; dieser sollte mindestens 24 Stunden (besser 48 Stunden) vor der Geburt liegen, da erst nach dieser Zeitspanne eine sichtbare Wirkung erwartet werden kann. Eine postnatale Betamethasongabe ist demzufolge für die sich rasch entwickelnde Erkrankung ohne Bedeutung (Baden, 5). Nach Linzey (78) scheint sich eine Betamethason-Prophylaxe zwischen der 30. und 32.Schwangerschaftswoche besonders zu bewähren.

Block et al. (14) untersuchten 1977 die Wirkung von Betamethason im Vergleich zu Methylprednisolon auf die Häufigkeit des Membransyndroms; dabei trat das Membransyndrom in der Betamethasongruppe mit 10,2% deutlich weniger häufig auf als in der Kontrollgruppe (27,3%) oder der Methylprednisolongruppe (28,6%). Die Unwirksamkeit von Methylprednisolon beruht nach Untersuchungen von Ballard (9) und Betins (11) darauf, daß Prednisolon im Vergleich zu Betamethason nur in begrenztem Maße die Plazentaschranke passiert. In Tierversuchen war die Unwirksamkeit von Methylprednisolon in diesem Zusammenhang bereits 1972 von Taeusch et al. (132) demonstriert worden.

Ballard (9) kam zu dem Ergebnis, daß beim Menschen 12 mg Betamethason zu einem erhöhten Glucocorticoidspiegel beim Feten führen; die Spiegel liegen jedoch in einem Bereich, der beim Feten auch streßinduziert während der Wehen erreicht wird.

Unter einer Betamethason-Therapie kommt es nach Angabe verschiedener Autoren, so z.B. Siebert und Meitinger (125) und Mund-Hoym (95), zu einem deutlichen Abfall der Östriolkonzentration.

Gennser (37) berichtet im Hinblick auf die Depression der mütterlichen und fetalen Nebennierenrindenfunktion, daß nach einer Betamethason-Therapie der Plasmacortisolspiegel der Mutter und des Feten durchschnittlich 1 - 2 Wochen erniedrigt ist; eine klinisch manifeste Nebennieren-

rindeninsuffizienz wurde jedoch nicht beobachtet. ACTH-Belastungsteste ergaben bei Neugeborenen kurz nach der Geburt normale Plasmacortisolerhöhungen.
Die Hemmung der fetalen Hypophysenfunktion führt zu einer reduzierten Synthese der $C_{19}$-Steroide in der fetalen Nebennierenrinde; die Produktion der Östrogene ist demnach herabgesetzt, vor allem die des Östriols ($E_3$), dessen Vorstufen zu 90% vom Feten stammen. Nach Gennser (37) kann das Östriol als Überwachungsparameter bei der Behandlung einer Risikoschwangerschaft mit Betamethason herangezogen werden.
Leyendecker et al. (76) untersuchten 1977 an mehreren Schwangeren, deren Gestationsalter zwischen der 32. und 38.Schwangerschaftswoche lag, den Einfluß von Betamethason auf die Serumkonzentrationen verschiedener Steroidmetaboliten. Sie kamen dabei zu folgenden Ergebnissen: Bei Cortisol war ein Abfall bis auf 16% der Ausgangskonzentration zu beobachten, bei Östradiol-17β bis auf 18%, bei Östriol bis auf 13% und bei 17-OH-Progesteron bis auf 40%. Dagegen zeigten die Serumkonzentrationen von Progesteron, das in diesem Stadium der Schwangerschaft fast ausschließlich von der Plazenta gebildet wird, und von Androstendion, das in der Spätschwangerschaft wahrscheinlich zum größten Teil aus den mütterlichen Ovarien stammt, keinen Abfall unter Betamethasongabe.
Ohrlander et al. (99) kamen in ihren Untersuchungen, die unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt wurden, zu ähnlichen Ergebnissen: während bei Östron ($E_1$) und Östradiol-17β ($E_2$) die Serumkonzentrationen unter Betamethasongabe bis auf 38% bzw. 29% absanken, zeigten diejenigen von Progesteron keine Veränderungen; die Konzentrationen im Fruchtwasser blieben ebenso nahezu unverändert.
Das in früheren Studien beobachtete starke Absinken des Cortisolspiegels im fetalen Plasma nach Betamethasongabe erscheint im Hinblick auf die anscheinend ausreichende

Verfügbarkeit von Progesteron, das als Vorstufe für die Cortisolsynthese in der fetalen Nebennierenrinde fungiert, nicht ganz verständlich und bedarf weiterer Abklärung.

## 1.3. Tamoxifen (Novaldex$^R$)

Tamoxifen ist ein spezifischer Östrogen-Antagonist, der in erster Linie zur palliativen Behandlung des fortgeschrittenen Mammakarzinoms eingesetzt wird; es wurde 1963 von der Firma ICI-Pharma synthetisiert und unter der Kennziffer ICI 46.474 klinisch geprüft. Die chemische Bezeichnung lautet 1-[4-(2-Dimethylaminoäthoxy)-phenyl]-trans-1,2-diphenyl-1-buten; das Molekulargewicht beträgt 563,6.

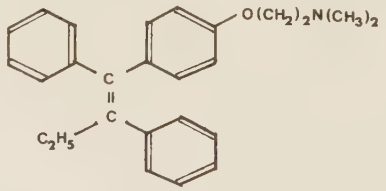



Abb.7: Strukturformel von Tamoxifen.

Tamoxifen wird oral in Citratform verabreicht. Über das Ausmaß der Absorption liegen bis heute erst wenige Ergebnisse vor. In Untersuchungen an mehreren Patientinnen lagen nach Gabe einer Einzeldosis von 20 mg radioaktiv markiertem Tamoxifen die maximalen Serumspiegel 4 - 7 Stunden später bei 0,06 - 0,1 µg/ml, wobei eine Halbwertzeit von 7 - 14 Stunden festgestellt wurde (Fromson et al., 33).
Bei hysterektomierten Patientinnen, die 4 - 96 Stunden vor dem Eingriff eine Einmaldosis von 20 mg markiertem Tamoxifen erhalten hatten, wurde im Uterus (vor allem im Endometrium) eine doppelt so hohe Tamoxifenkonzentration gefunden wie im Serum (Fromson und Sharp, 34). In Tierversuchen mit schwangeren Ratten wurde eine Anreicherung von Tamoxifen in den Ovarien beschrieben (Major et al., 84). Über die Aufnahme von Tamoxifen in Tumorgeweben liegen noch keine konkreten Ergebnisse vor.

Die Metabolisierung von Tamoxifen erfolgt hauptsächlich durch Hydroxylierung des aromatischen Komplexes und anschließende Glukuronidierung. Jordan et al. (63, 64) beschrieben in diesem Zusammenhang eine höhere antiöstrogene Aktivität bei Monohydroxytamoxifen als bei Dihydroxytamoxifen, jedoch hemmten beide in vitro die Bindung von $^{3}$H-Östradiol an die Östrogenrezeptoren; möglicherweise spielen diese Metaboliten eine unterstützende Rolle in der antiöstrogenen Aktivität von Tamoxifen.
Ausgeschieden wird Tamoxifen in erster Linie in glukuronidierter Form mit der Galle über die Faeces, ein geringer Teil erscheint auch im Urin. Da die Metabolisierung ziemlich langsam verläuft, konnte noch 2 Wochen nach der Applikation markiertes Tamoxifen im Plasma nachgewiesen werden (Fromson, 33).
In-vitro-Untersuchungen an Uterus-Homogenaten von Schweinen und Ratten haben gezeigt, daß die Prostaglandinproduktion im Uterus durch Tamoxifen deutlich gehemmt wird (Fenwick et al., 31; Sharm und Pugh, 122); die Produktion von Prostaglandin E war dabei stärker beeinträchtigt als die von Prostaglandin F und D. Ritchie (105) beobachtete an Homogenaten aus menschlichem Mammakarzinomgewebe eine dosisabhängige Bremswirkung von Tamoxifen auf die Aktivität der Prostaglandinsynthetase, was zu einer Reduktion der Synthese von Prostaglandin E bis zu 50% führte. Unter den Prostaglandinen findet sich eine Gruppe von Substanzen, die möglicherweise einen Einfluß auf die Knochenresorption haben (Greaves et al., 41; Ritchie, 105); es wird deshalb angenommen, daß die Besserung des Knochenbefalls, die bei einigen Patientinnen mit metastasierendem Mammakarzinom unter der Tamoxifenbehandlung auftrat, auf einen Hemmeffekt auf die Prostaglandinsynthese im Karzinomgewebe zurückzuführen ist.
Der Einfluß von Tamoxifen auf die Plasmaspiegel verschiedener Hormone war Gegenstand mehrerer Arbeiten. Senior et al. (121) beschrieben anhand von Untersuchungen an infer-

tilen Patientinnen einen deutlichen Anstieg der Östradiolkonzentration und in geringerem Maße auch der Progesteronkonzentration im Serum unter Tamoxifenbehandlung. Groom und Griffiths (42) fanden bei 6 gesunden Patientinnen nach 5 - 10tägiger Gabe von 20 mg Tamoxifen pro Tag während der Follikelphase des Menstruationszyklus trotz eines erhöhten Östradiolspiegels einen deutlichen Abfall des Prolaktinspiegels, was sie mit einem antagonistischen Effekt von Tamoxifen auf den Feedback-Mechanismus Östradiol-hypophysäre Prolaktinausschüttung erklärten. Jordan (60) kommt in Untersuchungen an Ratten zu ähnlichen Ergebnissen. Die Plasmaspiegel von LH, FSH und Progesteron änderten sich nur geringfügig.
Kurano et al. (71) fanden in Untersuchungen an Patientinnen mit anovulatorischem Zyklus, die nach der Menstruation 5 Tage lang 20 - 40 mg Tamoxifen täglich erhalten hatten, keine nennenswerten Veränderungen des FSH-Spiegels, während der LH-Spiegel bis auf das Doppelte der Werte vor der Behandlung anstieg.
Bei ovarektomierten Mammakarzinom-Patientinnen in der Postmenopause zeigten sich nach 2wöchiger Behandlung mit 40 mg Tamoxifen pro Tag signifikant erniedrigte Spiegel von LH und FSH (Golder et al., 40; Willis, 147; Willis et al., 148); die Reaktion auf Injektion von LHRH war jedoch nicht beeinträchtigt. Während Golder et al. keine bedeutende Veränderung des Prolaktinspiegels feststellten, berichtet Willis von einem signifikanten Abfall des Prolaktinspiegels bei denjenigen Patientinnen, die gut auf Tamoxifen ansprachen und zuvor erhöhte basale Prolaktinspiegel aufgewiesen hatten. Bei normalen Basalwerten wurde die Prolaktinsekretion durch Tamoxifen nicht beeinflußt. Die Reaktion auf TRH-Applikation war ebenfalls von der Höhe des basalen Prolaktinspiegels abhängig (Willis, 148).
Der Effekt von Tamoxifen auf den Östradiolspiegel scheint unterschiedlich zu sein: während einige Autoren (Golder

et al., 40; Kiang und Kennedy, 66) keine Veränderungen feststellen konnten, fanden Willis et al. (148) einen deutlichen Unterschied zwischen den Patientinnen, die gut auf Tamoxifen ansprachen (keine Veränderungen des Östradiolspiegels) und denjenigen, die nicht darauf ansprachen (signifikanter Anstieg des Östradiolspiegels); der Androgenspiegel blieb im allgemeinen unverändert (Willis, 148).

Tamoxifen wirkt sowohl beim Menschen als auch bei verschiedenen Säugetierarten antiöstrogen. Bei unreifen weiblichen Ratten, die gleichzeitig Östrogene und Tamoxifen erhielten, blieb die normalerweise zu beobachtende Zunahme des Uterusfrischgewichtes aus (Harper und Walpole, 47). Wurde Tamoxifen weiterhin reifen Rattenweibchen am entsprechenden Tag des Zyklus verabreicht, so wurde die Ovulation verzögert (Labhsetwar, 72), was auf eine Hemmung der Freisetzung von Progesteron zurückgeführt wird. Auch wurde nachgewiesen, daß Tamoxifen die Implantation befruchteter Eier verhindert, wofür die Freisetzung von Östradiol erforderlich ist (Harper und Walpole, 48, 49). Tamoxifen scheint hierbei in zweifacher Hinsicht eine antiöstrogene Wirkung auszuüben: es blockiert die Aktivität der Östrogene und hemmt deren endogene Produktion. Untersuchungen an weiblichen Schweinsaffen haben diese stark antiöstrogenen Eigenschaften von Tamoxifen bestätigt (Walpole, 140). In einigen Arbeiten wurde jedoch auch auf eine zuweilen auftretende schwache bzw. atypische östrogenartige Wirkung hingewiesen (Jordan, 62; Harper und Walpole, 47; Ferrazzi, 32; Koseki, 69).

Der genaue Wirkungsmechanismus von Tamoxifen ist noch nicht sicher geklärt; eine wichtige Rolle spielen aber auf alle Fälle die Östrogenrezeptoren, die als östrogenbindende Proteine im Zytoplasma östrogenabhängiger Gewebe wie Brustdrüsen- und Uterusgewebe enthalten sind.

Zirkulierendes Östrogen wird an dieses Protein gebunden, das je nach dem bei der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation verwendeten Puffer in 8S- oder 4S-Form extrahiert werden kann (Jordan, 61; Lippman, 79). Nach Bindung des Östrogens wird der Steroid-Rezeptor-Komplex transformiert und in den Zellkern verlagert. Dieser Prozeß ist energieabhängig. Es wird vermutet, daß der zytoplasmatische 8S-Komplex während der Translokation in einen neonuklearen 5S-Komplex umgewandelt wird (McGuire und DeLagarza, 88; McGuire et al., 89). Über einen noch unbekannten Mechanismus ist dieser Komplex anschließend an der DNS-Synthese beteiligt.

In-vitro-Untersuchungen von Tumorproben Tamoxifen-behandelter Patientinnen haben gezeigt, daß im Fall von Tumorremissionen der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die Zellen abnahm. Es wird angenommen, daß durch diese Verminderung der DNS-Synthese nach Tamoxifen-Anwendung das Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellneubildung auf die Seite der absterbenden Zellen verschoben wird (Nordenskjöld, 98).

Untersuchungen an menschlichen Mammakarzinomzellen in Gewebekulturen haben bestätigt, daß die Gegenwart von Östrogenrezeptoren für die Wirksamkeit von Tamoxifen notwendig ist; bei positivem Nachweis dieser Rezeptoren wurde die Zellteilung durch Tamoxifen gehemmt. Wie schon oben erwähnt, wird dabei vermutlich nach Bindung von Tamoxifen an den Rezeptor dieser "falsche" Komplex in den Zellkern verlagert, wo dann die "normalen" Prozesse nicht mehr ablaufen können (Jordan, 61; Lippman, 79). Der Hypothese, daß der Wirkungsmechanismus von Tamoxifen in einer Verhinderung des Nachschubs neuer Östrogenrezeptoren ins Zytoplasma bestehe (Nicholson et al., 97), ist in neueren Untersuchungen widersprochen worden (Koseki et al., 69). Es wird vielmehr eine kompetitive Hemmung der Bindung von Östradiol an die Östrogenrezeptoren durch Tamoxifen angenommen.

Die durch Tamoxifen bewirkte Wachstumshemmung einer rezeptorpositiven Zellkultur ließ sich durch gleichzeitige Anwendung von Östrogenen verhindern sowie auch durch deren spätere Zugabe wieder aufheben.
Tamoxifen hat keinen Einfluß auf hormonunabhängige Zellen, wohingegen hohe Östrogenkonzentrationen auf Zellen aller Kulturen, unabhängig von ihrem jeweiligen Rezeptorgehalt, einwirken. Nach Lippman (79) beruhen die Effekte von Tamoxifen auf der Hemmung eines Prozesses, der durch Östradiol stimuliert werden kann, d.h. die Wirkung ist spezifisch.
Nach Heuson (55) ist ein hoher Rezeptorgehalt mit einer hohen Remissionswahrscheinlichkeit korreliert. Auch dem Vorhandensein von Progesteron- und Glucocorticoid-Rezeptoren scheint ein Aussagewert zuzukommen, indem nämlich bei deren gleichzeitiger Anwesenheit mit Östrogenrezeptoren eine höhere Remissionsquote gefunden wurde (McGuire et al., 90; Allegra et al., 3).
Überraschenderweise haben jedoch auch rezeptornegative Patientinnen auf eine Tamoxifen-Therapie angesprochen; möglicherweise spielen hierbei die Prolaktinkonzentrationen und andere Rezeptoren (Tamoxifen konkurriert nachweislich auch um den Androgenrezeptor) eine Rolle (Lippman, 79).

Seit der Einführung von Tamoxifen in die Behandlung des fortgeschrittenen Mammakarzinoms sind zahlreiche Studien über die Wirksamkeit und Verträglichkeit durchgeführt worden; es seien hier nur einige herausgegriffen:
Bereits 1971/72 berichteten Cole et al. (17, 18) über erste Erfahrungen mit Tamoxifen; sie kamen dabei zu dem Ergebnis, daß Tamoxifen in der Therapie des fortgeschrittenen Mammakarzinoms zu ähnlichen Remissionsraten wie eine Hormonbehandlung mit Diäthylstilböstrol oder Methandrostenolon führt. In Arbeiten von Ward (142), der ebenfalls die Tamoxifen-Behandlung im Vergleich zur

Östrogen-, Androgen- bzw. Gestagen-Therapie untersuchte, wird dies bestätigt; Ward (142) stellte in diesem Zusammenhang auch fest, daß durch den Einsatz von Tamoxifen als erstem Mittel einerseits die Remissionswahrscheinlichkeit ansteigt, andererseits aber nicht die Wirksamkeit nachfolgender Hormontherapien gemindert wird. Bei Kombination von Tamoxifen mit einem Hormonpräparat lagen die Remissionsquoten etwas höher als bei der Monotherapie (Tormey et al., 138); allerdings traten bei der Kombinationstherapie Nebenwirkungen (Maskulinisierung, Ödeme, erhöhte Leberwerte) auf, die bei alleiniger Gabe von Tamoxifen so gut wie nicht beobachtet wurden.
Im Vergleich mit Zytostatika-Behandlungen ergaben sich bisher keine unterschiedlichen Ergebnisse (Priestman et al., 104; Baum, 10); Die Kombination von Tamoxifen und Zytostatika jedoch wird gegenwärtig als eine der wirksamsten unter den möglichen Therapieformen angesehen (Heuson, 55). Positive Erfahrungen bei gleichzeitiger Anwendung von Tamoxifen und Zytostatika werden auch von Bosch (15), Jungi und Wagenknecht (65), Morgan (92), Glick (38) und Tormey (138) berichtet. Allerdings muß auch hier mit einer Zunahme unerwünschter Nebenwirkungen gerechnet werden. Die Arbeiten von Heel et al. (52) und Mouridsen et al. (94) geben einen ausführlichen Überblick über den gegenwärtigen Stand der Erfahrungen mit Tamoxifen in der Behandlung des fortgeschrittenen Mammakarzinoms.

In den meisten der bisher vorliegenden Studien haben je nach Untersuchungsbedingungen zwischen 25 und 60% der Patientinnen auf eine Tamoxifen-Therapie angesprochen; 7 - 18% erreichten sogar eine komplette Remission für einige Monate (in Ausnahmefällen sogar für einige Jahre).
Allgemein wurde eine Abhängigkeit der Remissionsquote vom Menopausenstatus und Alter der behandelten Patien-

tinnen festgestellt: je länger sich die Patientinnen bei Therapiebeginn bereits in der Postmenopause befinden, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Behandlung. Eine Auswertung verschiedener Untersuchungen (z.B. Cole et al., 19; Ward, 141; Lerner et al., 74; Henningsen und Amberger, 54) hat einen Anstieg der Remissionen von ca. 23% bei 40 - 60jährigen auf ca. 42% bei über 70jährigen Patientinnen ergeben.
In einigen Fällen haben auch Patientinnen in der Prämenopause auf Tamoxifen angesprochen, wobei aber eine Unterdrückung der Menstruation unvermeidlich war; gelegentlich wurde bei diesen Patientinnen das Auftreten von Ovarialzysten beobachtet.
Während der Schwangerschaft ist Tamoxifen aufgrund der dargestellten Eigenschaften kontraindiziert.
An unerwünschten Nebenwirkungen wurden gelegentlich gastrointestinale Unverträglichkeitserscheinungen, Tumorschmerzen, Hautausschläge, Kopfschmerzen, Flüssigkeitsretention, vorübergehender Thrombozyten-, Leukozyten- und Hb-Abfall sowie reversible Hypercalcämien beobachtet.

Für die Behandlung des fortgeschrittenen Mammakarzinoms wird eine Dosierung von 20 - 40 mg Tamoxifen pro Tag empfohlen. Bei Überdosierung muß, wie Tierexperimente gezeigt haben, auch mit dem Auftreten östrogener Effekte gerechnet werden. Bei extremer Überdosierung in der Langzeitbehandlung traten in seltenen Fällen Sehstörungen auf.

## II. UNTERSUCHUNGEN

### 2.1. Grundzüge der Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit wurde in vitro der Einfluß von Betamethason und Tamoxifen auf die Umwandlungsrate des Stoffwechselschrittes von Pregnenolon zu Progesteron in der menschlichen Plazenta untersucht. Dazu wurden 11 Versuche mit der Doppelisotopenmethode nach Schindler und Siiteri (115, 126, 127) durchgeführt. Um eine mögliche Beziehung zwischen Umwandlungsraten und Enzymgehalt der jeweiligen Plazenta nachzuweisen, wurde zusätzlich der Proteingehalt jeder Plazenta bestimmt.
Für derartige Untersuchungen ist die Plazenta besonders gut geeignet, da sie einen ausgeprägten Steroidmetabolismus aufweist und leicht zugänglich ist; außerdem besteht zwischen unreifen und termingerechten Plazenten bezüglich ihrer metabolischen Kontinuität kein Unterschied (Gabbe, 36).

### 2.2. Material

#### 2.2.1. Lösungsmittel und Pufferlösung

Die verwendeten Substanzen wurden fast ausschließlich von der Fa.Merck, Darmstadt, bezogen und waren von analytischer Qualität. Selbst hergestellt wurde die einmolare Phosphatpufferlösung (pH 7,4): 9,596 g $Na_2HPO_4$ (Merck Nr. 6580) und 1,743 g $KH_2PO_4$ (Merck Nr.4873) wurden auf einer Mikrowaage abgewogen, in 1000 ml Aqua bidest. gelöst und anschließend mit einem pH-Meter überprüft.

#### 2.2.2. Kristalline Steroide

Es wurde Progesteron (4-Pregnen-3,20-dion; Molekulargewicht 314,5), bezogen von der Fa.Steraloids Inc., Pawling N.Y., in kristalliner Form und in Methanol gelöst verwendet.

2.2.3. Radioaktive Steroide

Die radioaktiven Steroide stammten aus dem Radiochemical Center Amersham.
Sie wurden zunächst im Gradientenelutionssäulenchromatographie-Verfahren nach Schindler (114) gereinigt und anschließend jeweils in 100 ml Methanol gelöst.
Die jeweilige Aktivität betrug:
[7(n)-$^{3}$H]-Progesteron spez.Aktivität 7,9 Ci/mmol
$\Delta^{5}$-[4-$^{14}$C]-Pregnenolon spez.Aktivität 55 mCi/mmol

2.2.4. Radioaktivitätsmeßgeräte

Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Tri-carb-Flüssigkeitsszintillationsspektrometer der Fa.Packard, Modell 3380, mit einem Absolute Activity Analyser, Modell 544.
Dazu wurden die Proben in verschließbare Polyäthylenzählgläschen gefüllt und in der Szintillationsflüssigkeit (960 ml Toluol gemischt mit 40 ml Permafluor TM 25x (PO-POP) der Fa.Packard) gelöst.
Die Lokalisation der radioaktiven Steroide auf den Dünnschichtplatten erfolgte mit Hilfe des Scanners II (LB 2723) der Fa.Berthold bei einer Laufgeschwindigkeit von 1200 mm/h und einer Empfindlichkeitseinstellung von 300 anhand der durch Linearschreiber aufgezeichneten Radioaktivitätsmaxima (s. 2.3.4.).

2.2.5. Dünnschichtplatten

20 x 20 cm große Glasplatten wurden zunächst mit Alkohol und Äther gereinigt, anschließend mit Kieselgel G (nach Stahl, Typ 60), Nr.7731 der Fa.Merck, beschichtet; dazu wurden 40 g Kieselgel in 80 ml Aqua dest. aufgeschüttelt und sofort mit einem von Stahl entwickelten Beschichtungsapparat (Fa.Desaga) in einer Schichtdicke von 0,25 mm auf die Glasplatten aufgetragen. Nach kurzem Trocknen

bei Zimmertemperatur wurden die Platten im Trockenschrank bei 110°C ca. 1 Stunde lang aktiviert.

2.2.6. Pharmaka

Betamethason (Celestan$^{R}$) und Tamoxifen (Nolvadex$^{R}$) wurden freundlicherweise von den Firmen BYK-ESSEX München bzw. ICI-Pharma Plankstadt als Reinsubstanzen zur Verfügung gestellt.

2.2.7. Plazenta

Für jeden der 11 Versuche wurde jeweils 1 Plazenta verwendet, die möglichst sofort nach der Geburt verarbeitet wurde (s. 2.3.2.).

Kurzanamnesen der jeweiligen Patientinnen:

Versuch 1

M.Z. JN 443/78
Alter: 40 Jahre
Blutgruppe: A, Rh pos.
Para: V
Termin: 19 Tage vor ET
Geburt: Sectio
Kind: weiblich, 3800 g, 53 cm, Apgar 5 / 8
Dauer der Geburt: ca. 16 min.
Plazenta: ca. 1000 g
Geburtszeit: 16.16 Uhr
Plazentageburt: 16.18 Uhr
Inkubationsbeginn: 17.20 Uhr

Versuch 2

C.B. JN 684/78
Alter: 22 Jahre
Blutgruppe: 0, Rh pos.
Para: II
Termin: 7 Tage vor ET

Geburt: Spontangeburt; Fruchtwasser gelblich-grün
Kind: weiblich, 2780 g, 50 cm, Apgar 9 / 10 / 10
Dauer der Geburt: 5 Std. 11 min.
Nabelschnur: Länge 48 cm, Durchm. 1,5 cm
Plazenta: ca. 700 g
Geburtszeit: 11.06 Uhr
Plazentageburt: 11.10 Uhr
Inkubationsbeginn: 12.20 Uhr

Versuch 3

A.S. JN 1004/78
Alter: 24 Jahre
Blutgruppe: 0, Rh pos.
Para: I
Termin: 17 Tage vor ET
Geburt: Spontangeburt; vorzeitiger Blasensprung; Fruchtwasser klar
Kind: männlich, 3020 g, 49 cm, Apgar 9 / 10
Dauer der Geburt: 8 Std. 21 min.
Nabelschnur: Länge 58 cm, Durchm. 1 cm
Plazenta: ca. 620 g
Geburtszeit: 10.19 Uhr
Plazentageburt: 10.25 Uhr
Inkubationsbeginn: 11.25 Uhr

Versuch 4

B.G. JN 447/78 PP
Alter: 27 Jahre
Blutgruppe: $A_1$, rh neg.
Para: I
Termin: 11 Tage vor ET
Geburt: Spontangeburt
Kind: weiblich, 3100 g, 49 cm, Apgar 9 / 10
Dauer der Geburt: 6 Std. 38 min.
Nabelschnur: Länge 43 cm, Durchm. 1,5 cm
Plazenta: 610 g

Geburtszeit: 10.05 Uhr
Plazentageburt: 10.20 Uhr
Inkubationsbeginn: 11.25 Uhr

Versuch 5

G.P. JN 1100/78
Alter: 26 Jahre
Blutgruppe: A, Rh pos.
Para: I
Termin: 16 Tage vor ET
Geburt: Spontangeburt; vorzeitiger Blasensprung
Kind: männlich, 3200 g, 49 cm, Apgar 9 / 10 / 10
Dauer der Geburt: 4 Std. 13 min.
Nabelschnur: Länge 34 cm, Durchm. 3 cm
Plazenta: 640 g
Geburtszeit: 15.52 Uhr
Plazentageburt: 15.58 Uhr
Inkubationsbeginn: 16.54 Uhr

Versuch 6

B.B. JN 496/78 PP
Alter: 30 Jahre
Blutgruppe: 0, Rh pos.
Para: III
Termin: am Termin
Geburt: Spontangeburt
Kind: weiblich, 3980 g, 54 cm, Apgar 9 / 10 / 10
Dauer der Geburt: 1 Std.
Nabelschnur: Länge 27 cm, Durchm. 1,7 cm
Plazenta: 690 g
Geburtszeit: 14.30 Uhr
Plazentageburt: 14.31 Uhr
Inkubationsbeginn: 15.28 Uhr

Versuch 7

M.N. JN 501/78 PP
Alter: 35 Jahre
Blutgruppe: 0, Rh pos.
Para: III
Termin: am Termin
Geburt: Spontangeburt
Kind: männlich, 3280 g, 51 cm, Apgar 9 / 10 / 10
Dauer der Geburt: 2 Std. 7 min.
Nabelschnur: Länge 55 cm, Durchm. 1 cm
Plazenta: 520 g
Geburtszeit: 14.22 Uhr
Plazentageburt: 14.25 Uhr
Inkubationsbeginn: 15.20 Uhr

Versuch 8

B.S. JN 36/79
Alter: 36 Jahre
Blutgruppe: $A_1$, Rh pos.
Para: II (Gravida IV)
Termin: am Termin
Geburt: Spontangeburt
Kind: männlich, 3200 g, 49 cm, Apgar 9 / 10
Dauer der Geburt: ca. 4 Std.
Nabelschnur: Länge 43 cm
Plazenta: 640 g
Geburtszeit: 11.46 Uhr
Plazentageburt: 11.49 Uhr
Inkubationsbeginn: 12.45 Uhr

Versuch 9

J.F. JN 221/79
Alter: 38 Jahre
Blutgruppe: 0, Rh pos.
Para: III

Termin: 27 Tage vor ET
Geburt: Spontangeburt
Kind: männlich, 2840 g, 46 cm, Apgar 10 / 10
Dauer der Geburt: 3 Std. 33 min.
Nabelschnur: Länge 50 cm, Durchm. 1 cm
Plazenta: 700 g
Geburtszeit: 10.51 Uhr
Plazentageburt: 11.00 Uhr
Inkubationsbeginn: 12.05 Uhr

Versuch 10

B.M. JN 252/79
Alter: 33 Jahre
Blutgruppe: 0, Rh pos.
Para: II
Termin: 8 Tage vor ET
Geburt: Spontangeburt
Kind: weiblich, 3210 g, 50 cm, Apgar 8 / 9 / 10
Dauer der Geburt: 3 Std. 18 min.
Nabelschnur: Länge 52 cm, Durchm. 1 cm
Plazenta: 590 g
Geburtszeit: 14.46 Uhr
Plazentageburt: 14.48 Uhr
Inkubationsbeginn: 15.48 Uhr

Versuch 11

M.K. JN 276/79
Alter: 25 Jahre
Blutgruppe: A, rh neg.
Para: I
Termin: 8 Tage vor ET
Geburt: Spontangeburt
Kind: männlich, 4560 g, Apgar 8 / 9 / 10
Dauer der Geburt: 6 Std. 28 min.
Nabelschnur: Länge 52 cm, Durchm. 1 cm

Plazenta: 790 g
Geburtszeit: 16.24 Uhr
Plazentageburt: 16.28 Uhr
Inkubationsbeginn: 17.21 Uhr

## 2.3. Durchführung der Untersuchungen

### 2.3.1. Vorbereitung der Versuche

Für jeden Ansatz eines Versuches wurden radioaktives $^{3}H$-Progesteron (ca.1,8 Mio.dpm) und radioaktives $^{14}C$-Pregnenolon (ca.1,1 Mio.dpm), gelöst in Methanol, in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben pipettiert. Die absolut in ml zugesetzte Menge wurde aufgrund der jeweiligen Aktivität der gerade verwendeten radioaktiven Substanz berechnet.

Der Inhalt des Erlenmeyerkolbens wurde unter Stickstoffventilation eingetrocknet. Danach wurden jeweils 10 ml Essigsäureäthylester dazugegeben und gut geschüttelt. Aus jedem Kolben wurden nun mit einer Eppendorf-Pipette 0,1 ml entnommen, in ein verschließbares Plastikröhrchen gefüllt, unter Warmluft eingetrocknet und im Kühlschrank bei $4^{o}C$ aufbewahrt. Das Verhältnis der in jedem Röhrchen enthaltenen radioaktiven Steroide Pregnenolon und Progesteron ($^{14}C$-Preg/$^{3}H$-Prog) bildete später die Grundlage zur Berechnung der Umwandlungsraten (s.2.3.7.).

Die noch im Erlenmeyerkolben verbliebenen 9,9 ml wurden wieder unter Stickstoffventilation eingetrocknet. Anschließend wurden die in Methanol gelösten Medikamente in ihrer jeweiligen Konzentration zugegeben, gut geschüttelt und auch unter Stickstoffventilation eingetrocknet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Erlenmeyerkolben mit Kunststoffolie verschlossen und im Kühlschrank bei $4^{o}C$ aufbewahrt.

### 2.3.2. Präparation und Inkubation des Plazentagewebes

Aus der kurz zuvor geborenen Plazenta wurden aus verschiedenen Bereichen des fötalen Anteils Gewebsstückchen

entnommen, wodurch die nicht ganz gleichmäßige Verteilung der Aktivität in der Plazenta ausgeglichen werden sollte (Zander, 153). Für jeden Ansatz wurden 2 g Plazenta (Feuchtgewicht) abgewogen.
Anschließend wurde das Gewebe etwa 1 Minute lang bei 4000 U/min. homogenisiert, wobei zum Schutz vor Überwärmung gekühlte Phosphatpufferlösung (pH 7,4) hinzugefügt wurde. Zum Homogenat wurde danach noch soviel Phosphatpuffer zugegeben, daß schließlich auf 1 g Plazentagewebe 10 ml Phosphatpufferlösung entfielen.
Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Enzymaktivität in den einzelnen Ansätzen zu erzielen, wurde das Homogenat noch zusätzlich einer Zentrifugation unterzogen (modifiziert nach Ryan-108 und Sobrevilla-129); dazu wurde das Homogenat in Plastikzentrifugenröhrchen gefüllt und etwa 10 min. lang bei 800 x g zentrifugiert. Der schaumige Überstand wurde verworfen. Die in den Zentrifugenröhrchen verbliebene Flüssigkeit wurde vorsichtig von dem noch größere Gewebsfetzen enthaltenden Sediment abpipettiert und in einem Glasgefäß gesammelt.
In jeden der vorbereiteten Erlenmeyerkolben (s.2.3.1.) wurden nun jeweils 10 ml des zentrifugierten Plazentahomogenates gegeben, und im Anschluß daran wurde sofort mit der Inkubation im Schüttelwasserbad bei 37°C unter Luftzutritt begonnen.
Durch Zugabe von 50 ml Essigsäureäthylester in jeden Erlenmeyerkolben wurde die Inkubation nach 15 min. beendet. (Diese Inkubationsdauer war von Hohlstein und Bader (6, 56) in einer kinetischen Studie als am günstigsten ermittelt worden). Von dem noch im Glasgefäß verbliebenen zentrifugierten Plazentahomogenat wurden für die Proteinbestimmung (s.2.3.8.) 10 ml in ein verschließbares Plastikröhrchen gefüllt und bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

2.3.3. Extraktion der Steroide

Der Inhalt der Erlenmeyerkolben wurde jeweils in einen Schütteltrichter gefüllt und 5 min. lang geschüttelt. Nach erfolgter Trennung wurde die die extrahierten Steroide enthaltende obere Fraktion in Rundkolben aufgefangen, während die untere noch jeweils zweimal mit 50 ml Essigsäureäthylester ausgeschüttelt wurde, wobei jedesmal die obere Fraktion im Rundkolben aufgefangen wurde. Die in jedem Rundkolben gesammelten Überstände wurden im Rotationsverdampfer unter Vakuum eingetrocknet und anschließend mit jeweils 15 ml Äthylacetat in Reagenzgläser übertragen.
Um die Progesteronfraktion bei den nachfolgenden Dünnschichtchromatographien sichtbar machen zu können, wurde nun in jedes Glas 1 ml einer Lösung dazugegeben, die aus 100 mg nicht markiertem kristallinen Progesteron, gelöst in 100 ml Methanol, bestand. Anschließend wurde der Inhalt der Reagenzgläser unter Stickstoffventilation eingetrocknet.

2.3.4. Dünnschichtchromatographie

Die weitere Auftrennung und Reinigung der Steroide erfolgte durch 4 verschiedene Dünnschichtchromatographie-Systeme, wobei die Pregnenolon-Fraktion jeweils eliminiert und nur die Progesteron-Fraktion weiterverarbeitet wurde. Der Inhalt jedes Reagenzglases wurde in einigen Tropfen Essigsäureäthylester gelöst und möglichst kleinflächig etwa 2 cm vom Rand entfernt unter Warmluftzufuhr auf die Dünnschichtplatten übertragen, die zuvor in 3 Bahnen aufgeteilt worden waren. Anschließend wurden jeweils zwei Platten in verschließbare Glasbehälter gestellt und mit jeweils 200 ml des jeweiligen Fließmittelsystems entwickelt.
Folgende Fließmittel wurden verwendet:
DS I : 130 ml Chloroform und 70 ml Essigsäureäthylester
DS II : 190 ml Dichlormethan und 10 ml Dioxan
DS III: 200 ml Chloroform

DS IV : 130 ml Isooctan und 70 ml Essigsäureäthylester

Die Dünnschichten III und IV wurden jeweils zweimal entwickelt.
Sobald die Platten entwickelt waren, wurden sie aus den Glasbehältern genommen, unter Warmluft (Fön) getrocknet und anschließend unter den Scanner gelegt, um die Verteilung der radioaktiv markierten Steroide aufzuzeichnen.

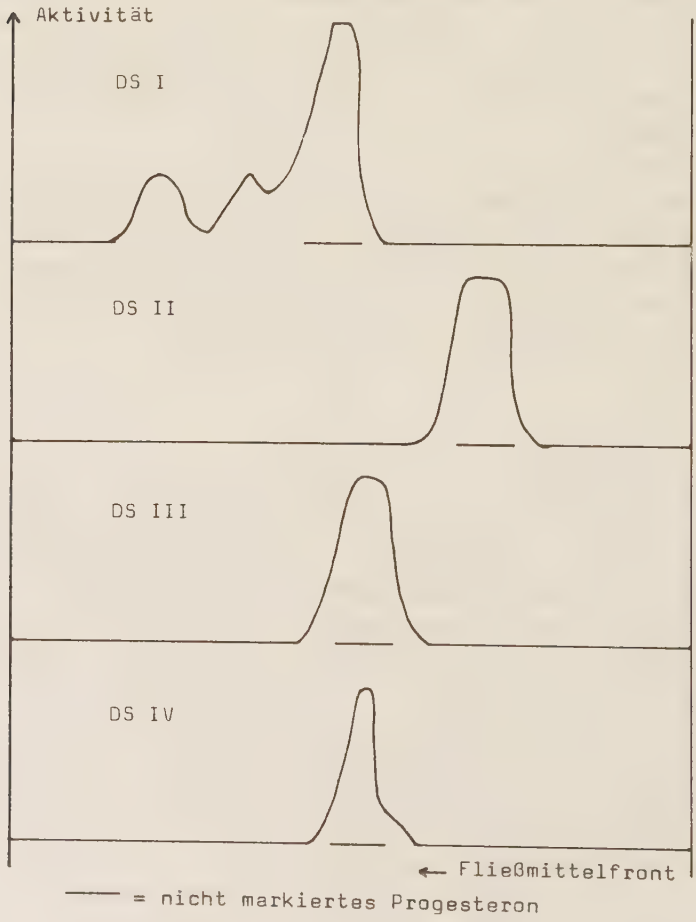



Abb.8: Beispiele für Chromatogramme.

Danach wurden die Platten mit Aqua bidest. besprüht, wodurch das vorher zugesetzte nicht markierte Progesteron als weißer Fleck zur Darstellung kam. Nachdem dessen Position mit dem Aktivitätsmaximum des Chromatogramms verglichen worden war, wurde der den weißen Fleck enthaltende Bezirk von der Platte abgetragen und in eine Glasfritte gefüllt; anschließend wurden die darin enthaltenen Steroide mit ca. 10 ml Essigsäureäthylester in ein Reagenzglas eluiert.
Vor der weiteren Verarbeitung wurde der Inhalt der Reagenzgläser unter Stickstoffventilation eingetrocknet.

### 2.3.5. Acetylierung

Um etwaige Verunreinigungen (z.B. Pregnenolon; die freie OH-Gruppe des Pregnenolons wird acetyliert, Progesteron ist nicht acetylierbar) noch gezielter eliminieren zu können, wurde nach der zweiten Dünnschichtchromatographie eine Acetylierung durchgeführt.
In jedes Reagenzglas wurden, sobald der Inhalt vorher unter Stickstoffventilation eingetrocknet worden war, 0,5 ml Pyridin und 0,5 ml Essigsäureanhydrid pipettiert. Nach etwa 12 - 16 Stunden wurde die Acetylierung durch Verdampfen und Absaugen unter Vakuum beendet.

### 2.3.6. Kristallisation

Nachdem das Eluat der vierten Dünnschichtchromatographie unter Stickstoffventilation eingetrocknet worden war, wurde es mit Essigsäureäthylester in dünnwandige Kristallisationsgläschen übertragen und wieder unter Stickstoffventilation eingetrocknet. Nach Zugabe von jeweils etwa 10 mg kristallinem nicht markiertem Progesteron wurde der Inhalt jedes Gläschens mit möglichst wenig Methanol im Wasserbad bei etwa 80°C aufgelöst.
Nun wurden einige Tropfen Äther hinzugefügt und die ganze Lösung nochmals kurz im Wasserbad erwärmt. Die Gläs-

chen wurden dann bei Zimmertemperatur aufbewahrt, bis die Ausfällung in kristalliner Form erfolgt war. Sodann wurde aus jedem Gläschen die Flüssigkeit über den Kristallen (Mutterflüssigkeit, = Mf) in Plastikzählröhrchen abpipettiert und unter Warmluft eingetrocknet. Von den ausgefallenen Kristallen wurde etwa ein Viertel entnommen und ebenfalls in ein Plastikzählröhrchen gegeben. Anschließend wurden zu den in jedem Gläschen verbliebenen Kristallen wieder einige mg kristallines nicht markiertes Progesteron hinzugefügt und der gesamte Vorgang noch zweimal mit einigen Tropfen Ligroin bzw. Cyclohexan (s. Tabelle) wiederholt.

Reihenfolge der Kristallisationssysteme:

1.Kristallisationssystem : Methanol / Äther
2. " : Methanol / Ligroin
3. " : Methanol / Cyclohexan

Nachdem aus jedem Kristallisationsgläschen insgesamt dreimal Mutterflüssigkeit und Kristalle entnommen worden waren, wurden in jedes Plastikzählröhrchen 15 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt. Nach 24-stündigem Temperaturausgleich erfolgte im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer jeweils 5 min. lang die Messung der Radioaktivität (3 Durchgänge).

### 2.3.7. Berechnung der Umwandlungsraten

Die Umwandlungsraten geben jeweils an, wieviel % des zugesetzten $^{14}$C-Pregnenolons mit Hilfe des plazentaren 3ß-ol-Dehydrogenase-$\Delta^5$-$\Delta^4$-Isomerase-Systems nach 15-minütiger Inkubation in $^{14}$C-markiertes Progesteron umgewandelt wurden.

Als Grundlage zur Berechnung wurden Untersuchungen von Schindler (116) herangezogen. Dabei wurden bei der Berechnung der Umwandlung von $^{14}$C-markiertem Pregnenolon in $^{14}$C-markiertes Progesteron bei gleichzeitiger Zugabe von $^{3}$H-markiertem Progesteron folgende Parameter zuein-

ander in Beziehung gesetzt:

Anfangsverhältnis AV = Preg-$^{14}C$ / Prog-$^{3}H$
Endverhältnis EV = Prog-$^{14}C$ / Prog-$^{3}H$

Das AV ergab sich jeweils aus den Proben, die aus den einzelnen Ansätzen vor der Inkubation entnommen worden waren (s. 2.3.1.).
Das EV ergab sich durch Mitteln der Verhältnisse, die für jede der 3 Kristallfraktionen ermittelt worden waren.

Die Umwandlung von markiertem Pregnenolon in markiertes Progesteron läßt sich demnach folgendermaßen berechnen:

$$\text{Umwandlungsrate } U = \frac{EV}{AV} \times 100 \quad (\%).$$

( U = Umwandlungsrate in % ).

2.3.8. Proteinbestimmung

Um eine mögliche Beziehung zwischen der Höhe der Umwandlungsrate (ohne Medikamentenzugabe = Kontrolle) und dem Enzym- bzw. Eiweißgehalt der Plazenta nachzuweisen, wurde eine photometrische Bestimmung des Proteinsgehalts jeder Plazenta nach der Methode von Miller (91), die eine Modifikation der Methode von Lowry (82) darstellt, durchgeführt.

Reagentien:
a) 10%iges $Na_2CO_3$ in 0,5 n NaOH
b) Lösung aus 0,5%igem $CuSO_4$ und 1%igem NaK-Tartrat
c) Folin: Folin-Ciocaltens Phenolreagenz (Merck Nr.9001)
1 : 11 verdünnt mit Aqua bidest.

Reagenz.: 100 ml a) gemischt mit 10 ml b) (muß zu jeder Bestimmung frisch angesetzt werden)
Folin wurde bei 4°C in brauner Flasche gelagert.
Durchführung:
Die bei Zimmertemperatur aufgetauten, gut durchmischten Fraktionen (s. 2.3.2.) wurden 1:80 mit $H_2O$ verdünnt.

Es wurden angesetzt:

| | | |
|---|---|---|
| Für den Ansatz | : | 1 ml verdünnte Fraktion |
| | | 1 ml Reagenz |
| Für den Leerwert | : | 1 ml $H_2O$ |
| | | 1 ml Reagenz |

Das Gemisch wurde gut geschüttelt und anschließend 10 min. lang bei Zimmertemperatur stehengelassen; daraufhin wurden rasch 3 ml Folinreagenz dazugegeben. Nach erneutem Schütteln erfolgte 10 min. lang die Inkubation im Wasserbad bei 50°C. Nach Abkühlen bei Zimmertemperatur wurde der Ansatz im Photometer bei 578 nm gegen den Leerwert gemessen.
Für die Bestimmung des Proteingehaltes aus dem Extinktionswert wurde eine Eichkurve mit bekannten Konzentrationen von Rinderalbumin hergestellt:

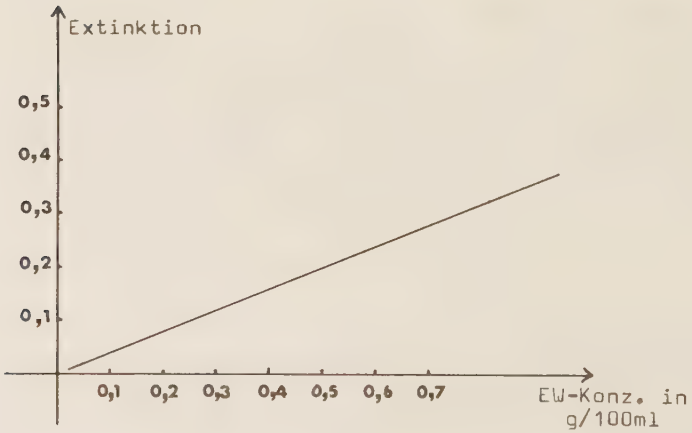



Abb.9: Eichkurve für die Bestimmung des Proteingehaltes.

# III. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN

## 3.1. $^{14}C$ / $^{3}H$-Ratios der Versuche 1 - 11

Versuch 1

| | AV | 1mf | 1kr | 2mf | 2kr | 3mf | 3kr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Contr. | 0,4989 | 0,4339 | 0,3870 | 0,4267 | 0,3871 | 0,4013 | 0,3800 |
| Beta | | | | | | | |
| $10^{-4}$ | 0,7260 | 0,4672 | 0,4373 | 0,4303 | 0,4337 | 0,4375 | 0,4330 |
| $10^{-6}$ | 0,6961 | 0,5109 | 0,4480 | 0,4916 | 0,4532 | 0,4403 | 0,4523 |
| $10^{-8}$ | 0,7151 | 0,5305 | 0,5993 | 0,5312 | 0,5596 | 0,5301 | 0,5288 |
| $10^{-10}$ | 0,6488 | 0,5405 | 0,5472 | 0,4976 | 0,5638 | 0,4861 | 0,5179 |
| Tam | | | | | | | |
| $10^{-4}$ | 0,7334 | 0,4200 | 0,3844 | 0,4255 | 0,4296 | 0,4133 | 0,4096 |
| $10^{-6}$ | 0,7181 | 0,6562 | 0,6379 | 0,5607 | 0,5412 | 0,5251 | 0,5405 |
| $10^{-8}$ | 0,7453 | 0,6246 | 0,5807 | 0,5841 | 0,6435 | 0,6493 | 0,6218 |
| $10^{-10}$ | 0,7329 | 0,5540 | 0,5489 | 0,5503 | 0,5357 | 0,5571 | 0,5684 |

Versuch 2

| | AV | 1mf | 1kr | 2mf | 2kr | 3mf | 3kr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Contr. | 0,6000 | 0,2635 | 0,2958 | 0,2752 | 0,2690 | 0,2786 | 0,3243 |
| Beta | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,6777 | 0,1123 | 0,1211 | 0,1324 | 0,1292 | 0,1404 | 0,1684 |
| $10^{-5}$ | 0,6221 | 0,1810 | 0,2261 | 0,1809 | 0,2187 | 0,2399 | 0,3456 |
| $10^{-7}$ | 0,6415 | 0,3224 | 0,3065 | 0,3075 | 0,3229 | 0,3156 | 0,3047 |
| $10^{-9}$ | 0,6301 | 0,2682 | 0,2968 | 0,2722 | 0,2872 | 0,2866 | 0,3217 |
| Tam | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,6103 | 0,0836 | 0,0772 | 0,0805 | 0,0806 | 0,0881 | 0,0841 |
| $10^{-5}$ | 0,6008 | 0,2780 | 0,2402 | 0,2578 | 0,2521 | 0,2812 | 0,2403 |
| $10^{-7}$ | 0,5756 | 0,2658 | 0,2574 | 0,2851 | 0,2561 | 0,2835 | 0,2565 |
| $10^{-9}$ | 0,6324 | 0,3030 | 0,3014 | 0,3110 | 0,3032 | 0,3247 | 0,3454 |

Versuch 3

| | AV | 1mf | 1kr | 2mf | 2kr | 3mf | 3kr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Contr. | 0,5280 | 0,3054 | 0,2804 | 0,3498 | 0,2573 | 0,2877 | 0,2801 |
| Beta | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,5930 | 0,1634 | 0,1579 | 0,1732 | 0,1450 | 0,1511 | 0,1466 |
| $10^{-5}$ | 0,5180 | 0,2723 | 0,2118 | 0,2240 | 0,2186 | 0,2316 | 0,2161 |
| $10^{-7}$ | 0,5421 | 0,2817 | 0,2752 | 0,2981 | 0,2800 | 0,2899 | 0,2737 |
| $10^{-9}$ | 0,5307 | 0,3365 | 0,2739 | 0,2859 | 0,3176 | | 0,2834 |
| Tam | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,5930 | 0,1404 | 0,1209 | 0,1214 | 0,1071 | 0,1355 | 0,1140 |
| $10^{-5}$ | 0,5600 | 0,3511 | 0,2833 | | 0,2589 | 0,3494 | 0,2924 |
| $10^{-7}$ | 0,5470 | 0,2981 | 0,2703 | 0,3054 | 0,2741 | 0,3029 | 0,2737 |
| $10^{-9}$ | 0,5318 | 0,2989 | 0,2851 | 0,3414 | 0,2580 | 0,3303 | 0,2880 |

Versuch 4

| | AV | 1mf | 1kr | 2mf | 2kr | 3mf | 3kr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Contr. | 0,5521 | 0,2899 | 0,2941 | 0,3006 | 0,2935 | 0,2983 | 0,2947 |
| Beta | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,5650 | | 0,0724 | 0,1036 | | 0,0751 | 0,0656 |
| $10^{-4}$ | 0,5580 | 0,1623 | 0,1362 | 0,1844 | 0,1363 | 0,1460 | 0,1570 |
| $10^{-5}$ | 0,5622 | 0,1957 | 0,1765 | 0,1805 | 0,1777 | 0,1816 | 0,1832 |
| $10^{-6}$ | 0,5443 | 0,2265 | 0,2152 | 0,2182 | 0,2132 | 0,2234 | 0,2219 |
| $10^{-7}$ | 0,5795 | | 0,2504 | 0,3022 | 0,2933 | 0,2571 | 0,2870 |
| $10^{-9}$ | 0,5816 | 0,3030 | 0,2516 | 0,2998 | 0,2923 | 0,2597 | 0,2949 |
| Tam | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,5665 | 0,0821 | 0,0673 | 0,0817 | 0,0741 | 0,0813 | 0,0735 |
| $10^{-4}$ | 0,5546 | 0,1622 | 0,1370 | 0,1835 | 0,1364 | 0,1545 | 0,1588 |
| $10^{-5}$ | 0,5691 | 0,3116 | 0,3893 | 0,2989 | 0,3220 | 0,3576 | 0,2712 |
| $10^{-6}$ | 0,5359 | 0,2711 | 0,2757 | 0,2685 | 0,3040 | 0,2735 | 0,2898 |
| $10^{-7}$ | 0,5338 | | 0,2577 | 0,3010 | 0,2988 | 0,3155 | |
| $10^{-9}$ | 0,5146 | 0,2938 | 0,2567 | 0,2922 | 0,2605 | 0,2720 | 0,2586 |

Versuch 5

| | AV | 1mf | 1kr | 2mf | 2kr | 3mf | 3kr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Contr. | 0,5835 | 0,1974 | 0,2326 | 0,2010 | 0,2330 | 0,2017 | 0,2458 |
| Beta | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,6083 | 0,1148 | 0,1151 | 0,1163 | 0,1062 | 0,1156 | |
| $10^{-4}$ | 0,5966 | 0,2394 | 0,1359 | 0,1604 | 0,1259 | 0,1346 | 0,1309 |
| $10^{-5}$ | 0,5827 | 0,1618 | 0,1541 | 0,1556 | 0,1786 | 0,1550 | 0,1764 |
| $10^{-6}$ | 0,5811 | 0,2267 | 0,1892 | 0,1828 | 0,1883 | 0,1706 | 0,1874 |
| $10^{-7}$ | 0,5808 | 0,2555 | | 0,1842 | 0,1858 | 0,1712 | |
| $10^{-9}$ | 0,5713 | 0,2604 | 0,2094 | 0,2400 | 0,2387 | 0,2144 | |
| Tam | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,5858 | | 0,0858 | 0,0879 | | 0,0844 | 0,0843 |
| $10^{-4}$ | 0,5861 | 0,1638 | 0,1544 | 0,1557 | 0,1735 | 0,1544 | 0,1756 |
| $10^{-5}$ | 0,5970 | 0,2096 | 0,2067 | 0,1900 | | 0,1818 | 0,2134 |
| $10^{-6}$ | 0,5934 | 0,2108 | 0,2110 | 0,1871 | 0,2128 | 0,1892 | 0,2147 |
| $10^{-7}$ | 0,5841 | 0,2688 | 0,2131 | 0,2360 | 0,2433 | 0,2139 | |
| $10^{-9}$ | 0,5701 | 0,2989 | 0,2486 | 0,2453 | 0,2419 | 0,2244 | 0,2482 |

Versuch 6

| | AV | 1mf | 1kr | 2mf | 2kr | 3mf | 3kr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Contr. | 0,5609 | 0,3293 | 0,3212 | 0,3260 | 0,3437 | 0,3359 | 0,3835 |
| Beta | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,6035 | 0,1592 | 0,1548 | 0,1704 | 0,1525 | 0,1575 | 0,1790 |
| $10^{-4}$ | 0,6133 | 0,2976 | 0,2989 | 0,3154 | 0,3121 | | |
| $10^{-5}$ | 0,6128 | 0,3511 | 0,3977 | 0,3479 | 0,3374 | 0,3446 | 0,3444 |
| $10^{-6}$ | 0,5575 | 0,3464 | 0,3514 | 0,3548 | 0,3363 | 0,3462 | 0,3374 |
| Tam | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,5539 | 0,0689 | 0,0669 | 0,0771 | 0,0658 | 0,0781 | 0,0762 |
| $10^{-4}$ | 0,5747 | 0,2760 | 0,2996 | 0,2892 | 0,2733 | 0,2806 | 0,2803 |
| $10^{-5}$ | 0,5887 | 0,2917 | 0,2909 | 0,2930 | 0,2986 | 0,3051 | 0,3341 |
| $10^{-6}$ | 0,5677 | 0,3417 | 0,3461 | 0,3264 | 0,3206 | 0,3477 | 0,3776 |

Versuch 7

| | AV | 1mf | 1kr | 2mf | 2kr | 3mf | 3kr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Contr. | 0,5554 | 0,2604 | 0,3086 | 0,2528 | 0,2670 | 0,2643 | 0,2616 |
| Beta | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,6121 | 0,1116 | 0,1123 | 0,1114 | 0,1120 | 0,1186 | 0,1285 |
| $10^{-4}$ | 0,5590 | 0,2510 | 0,2475 | 0,2420 | 0,2524 | 0,2655 | 0,2544 |
| $10^{-5}$ | 0,5648 | 0,2979 | 0,2863 | 0,2798 | 0,2885 | 0,3063 | 0,3220 |
| $10^{-6}$ | 0,5704 | 0,2839 | 0,2753 | 0,2692 | 0,2789 | 0,2758 | 0,2841 |
| Tam | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,5338 | 0,0600 | 0,0595 | 0,0581 | 0,0605 | 0,0657 | 0,0679 |
| $10^{-4}$ | 0,5827 | 0,2071 | 0,2099 | 0,2003 | 0,2035 | 0,2191 | 0,2286 |
| $10^{-5}$ | 0,5617 | 0,2360 | 0,2393 | 0,2261 | 0,2331 | 0,2347 | 0,2807 |
| $10^{-6}$ | 0,5674 | 0,2926 | 0,2885 | 0,2939 | 0,2814 | 0,2820 | 0,3311 |

Versuch 8

| | AV | 1mf | 1kr | 2mf | 2kr | 3mf | 3kr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Contr. | 1,1639 | 0,8902 | 1,1082 | 0,9100 | 1,0921 | 0,8875 | 0,9573 |
| Beta | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 1,6266 | 0,6093 | 0,6502 | 0,6039 | 0,6218 | 0,6052 | 0,7063 |
| $10^{-4}$ | 1,0092 | 0,6953 | 0,7257 | 0,6888 | 0,8474 | 0,6889 | 0,8369 |
| $10^{-5}$ | 1,1029 | 0,8890 | 1,0118 | 0,8738 | 0,8558 | 0,9033 | |
| $10^{-6}$ | 0,9867 | 0,8487 | 0,8720 | 0,7874 | 0,9511 | 0,8283 | 0,7929 |
| Tam | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 1,1783 | 0,2569 | 0,2963 | 0,2537 | 0,2619 | 0,2602 | 0,2970 |
| $10^{-4}$ | 1,0964 | 0,6962 | 0,7765 | 0,7340 | 0,7157 | 0,7919 | 0,8374 |
| $10^{-5}$ | 1,1600 | 0,8367 | 0,8954 | 0,8574 | 0,8420 | 0,8125 | 0,9885 |
| $10^{-6}$ | 1,1598 | 0,8500 | 0,8911 | 0,8597 | 0,8617 | 0,8415 | 1,0244 |

Versuch 9

| | AV | 1mf | 1kr | 2mf | 2kr | 3mf | 3kr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Contr. | 0,6422 | 0,6102 | 0,5855 | 0,6536 | 0,5801 | 0,5862 | 0,5751 |
| Beta | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,6823 | 0,3035 | 0,3058 | 0,3081 | 0,3056 | 0,3120 | |
| $10^{-4}$ | 0,6544 | 0,3008 | 0,3138 | 0,3196 | 0,2983 | 0,2994 | 0,3368 |
| $10^{-5}$ | 0,6497 | 0,4969 | 0,5341 | 0,5319 | 0,5236 | 0,5004 | 0,5040 |
| $10^{-6}$ | 0,6584 | 0,5456 | 0,5869 | 0,5784 | 0,5570 | 0,5804 | 0,5719 |
| Tam | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,6622 | 0,1862 | 0,1832 | 0,1805 | 0,1837 | 0,1795 | 0,2058 |
| $10^{-4}$ | 0,5907 | 0,3239 | 0,3424 | 0,3329 | 0,3342 | 0,3301 | 0,3427 |
| $10^{-5}$ | 0,6486 | 0,3920 | 0,4288 | 0,3925 | 0,4205 | 0,4318 | 0,4811 |
| $10^{-6}$ | 0,6538 | 0,4834 | 0,4959 | 0,4470 | 0,4650 | 0,4728 | 0,5326 |

Versuch 10

| | AV | 1mf | 1kr | 2mf | 2kr | 3mf | 3kr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Contr. | 0,6389 | 0,3535 | 0,3464 | 0,3362 | 0,3807 | 0,3414 | 0,3508 |
| Beta | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,6748 | 0,1239 | 0,1281 | 0,1238 | 0,1266 | 0,1242 | 0,1269 |
| $10^{-4}$ | 0,6610 | 0,2611 | 0,2688 | 0,2685 | 0,2710 | 0,2676 | 0,2752 |
| $10^{-5}$ | 0,6274 | 0,2958 | 0,2946 | 0,3003 | 0,2984 | 0,2944 | 0,2926 |
| $10^{-6}$ | 0,6617 | 0,3471 | 0,3678 | 0,3563 | 0,3668 | 0,3504 | 0,3557 |
| Tam | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,6657 | 0,0839 | 0,0846 | 0,0842 | 0,0850 | 0,0851 | 0,0884 |
| $10^{-4}$ | 0,6794 | 0,2860 | 0,2907 | 0,2750 | 0,2838 | 0,3088 | 0,2884 |
| $10^{-5}$ | 0,6537 | 0,2956 | 0,3031 | 0,2901 | 0,2947 | 0,2963 | |
| $10^{-6}$ | 0,6504 | 0,3032 | 0,3134 | 0,3046 | 0,3159 | 0,3051 | 0,3228 |

Versuch 11

| | AV | 1mf | 1kr | 2mf | 2kr | 3mf | 3kr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Contr. | 0,7575 | 0,2937 | 0,2993 | 0,2910 | 0,3418 | 0,3163 | 0,3205 |
| Beta | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,7253 | 0,1010 | 0,0998 | 0,1012 | 0,1004 | 0,1014 | 0,1001 |
| $10^{-4}$ | 0,7585 | 0,2284 | 0,2173 | 0,2106 | 0,2502 | 0,2313 | 0,2337 |
| $10^{-5}$ | 0,7611 | 0,2713 | 0,2783 | 0,2709 | 0,3061 | 0,2884 | 0,2922 |
| $10^{-6}$ | 0,7580 | 0,2908 | 0,2966 | 0,2886 | 0,3436 | 0,3164 | 0,3201 |
| Tam | | | | | | | |
| $10^{-3}$ | 0,7500 | 0,0577 | 0,0527 | 0,0525 | 0,0533 | 0,0531 | 0,0530 |
| $10^{-4}$ | 0,7542 | 0,2248 | 0,2311 | 0,2225 | 0,2349 | 0,2294 | 0,2353 |
| $10^{-5}$ | 0,7430 | 0,2457 | 0,2528 | 0,2574 | 0,2493 | 0,2415 | 0,2510 |
| $10^{-6}$ | 0,7554 | 0,3172 | 0,3280 | 0,3191 | 0,3273 | 0,3165 | 0,3276 |

Erläuterung der Abkürzungen:

| | | |
|---|---|---|
| Contr. | = | Kontrolle |
| Beta | = | Betamethason |
| Tam | = | Tamoxifen |
| AV | = | Anfangsverhältnis |
| 1mf | = | 1.Mutterflüssigkeit |
| 1kr | = | 1.Kristallisation |
| 2mf | = | 2.Mutterflüssigkeit |
| 2kr | = | 2.Kristallisation |
| 3mf | = | 3.Mutterflüssigkeit |
| 3kr | = | 3.Kristallisation |
| $10^{-3}$ etc. | = | Konzentrationsangabe der verwendeten Medikamente in Mol/l |

3.2. Umwandlungsraten der Versuche 1 - 11 in %.

Betamethason

| | $V_1$ | $V_2$ | $V_3$ | $V_4$ | $V_5$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Contr. | 77,1 | 49,4 | 51,6 | 53,3 | 40,6 |
| $10^{-3}$ | | 20,6 | 25,3 | 12,2 | 18,1 |
| $10^{-4}$ | 59,8 | | | 25,7 | 22,0 |
| $10^{-5}$ | | 42,3 | 41,6 | 31,9 | 29,1 |
| $10^{-6}$ | 64,8 | | | 39,8 | 32,4 |
| $10^{-7}$ | | 48,5 | 50,9 | 47,7 | 31,9 |
| $10^{-8}$ | 78,6 | | | | |
| $10^{-9}$ | | 47,9 | 54,9 | 48,1 | 39,2 |
| $10^{-10}$ | 83,6 | | | | |

| | $V_6$ | $V_7$ | $V_8$ | $V_9$ | $V_{10}$ | $V_{11}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Contr. | 62,3 | 50,3 | 90,4 | 90,3 | 56,2 | 42,3 |
| $10^{-3}$ | 26,9 | 19,2 | 40,5 | 44,8 | 18,8 | 13,8 |
| $10^{-4}$ | 49,8 | 45,0 | 79,6 | 48,3 | 41,0 | 30,8 |
| $10^{-5}$ | 58,7 | 52,9 | 84,7 | 80,1 | 47,1 | 37,4 |
| $10^{-6}$ | 61,3 | 49,0 | 88,4 | 86,9 | 54,9 | 41,6 |

Tamoxifen

| | $V_1$ | $V_2$ | $V_3$ | $V_4$ | $V_5$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Contr. | 77,1 | 49,4 | 51,6 | 53,3 | 40,6 |
| $10^{-3}$ | | 13,2 | 19,2 | 12,6 | 14,5 |
| $10^{-4}$ | 55,6 | | | 26,0 | 28,6 |
| $10^{-5}$ | | 40,7 | 49,6 | 57,5 | 35,2 |
| $10^{-6}$ | 79,8 | | | 54,0 | 35,9 |
| $10^{-7}$ | | 44,6 | 49,8 | 52,1 | 39,0 |
| $10^{-8}$ | 82,5 | | | | |
| $10^{-9}$ | | 50,1 | 52,1 | 50,2 | 43,1 |
| $10^{-10}$ | 75,2 | | | | |

| | $V_6$ | $V_7$ | $V_8$ | $V_9$ | $V_{10}$ | $V_{11}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Contr. | 62,3 | 50,3 | 90,4 | 90,3 | 56,2 | 42,3 |
| $10^{-3}$ | 12,6 | 11,7 | 24,2 | 28,8 | 12,9 | 7,0 |
| $10^{-4}$ | 49,5 | 36,7 | 70,8 | 57,5 | 42,3 | 31,8 |
| $10^{-5}$ | 52,3 | 44,7 | 78,3 | 68,4 | 45,7 | 33,7 |
| $10^{-6}$ | 61,3 | 52,9 | 79,8 | 81,4 | 48,8 | 42,7 |

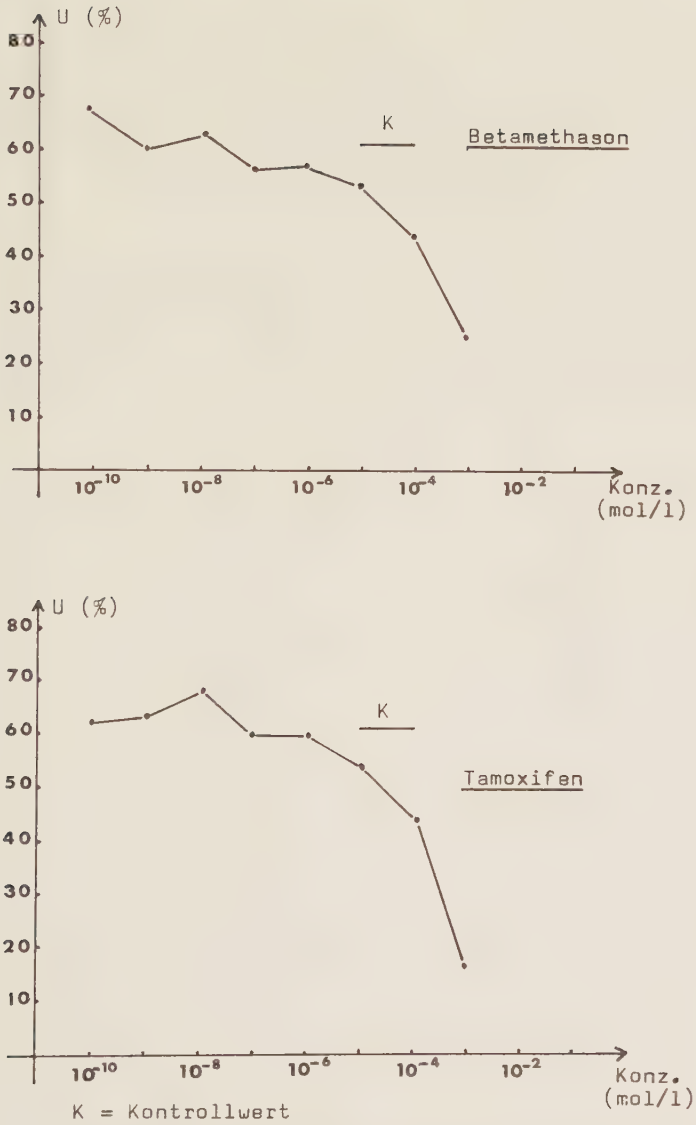



Abb.10: Darstellung der ermittelten Umwandlungsraten in Abhängigkeit von der Konzentration.

### 3.3. Ergebnisse der Proteinbestimmung

Zwischen Progesteronsyntheserate und Protein- bzw. Enzymgehalt der Plazenta konnte eine lineare Beziehung, wie sie von Depp (24) und Ryan (108) für die Plazenta und von Shinada (124) für die Corpora lutea beschrieben wird, mit der verwendeten Methode nicht nachgewiesen werden, was durch die Untersuchungen von Hohlstein (56) und Bader (6) bestätigt wird.
Möglicherweise wird dies durch die von Pearlman (102) beobachtete Tatsache beeinflußt, wonach die Gesamtaktivität von eingefrorenem Plazentahomogenat zwar unverändert bleibt, sich aber beim Auftauen Präzipitate mit wechselndem Aktivitätsgehalt bilden können.

| | Extinktion | EW-Konz. in g/100 ml |
|---|---|---|
| $V_1$ | 0,242 | 0,57 |
| $V_2$ | 0,238 | 0,56 |
| $V_3$ | 0,189 | 0,45 |
| $V_4$ | 0,158 | 0,37 |
| $V_5$ | 0,261 | 0,61 |
| $V_6$ | 0,171 | 0,40 |
| $V_7$ | 0,260 | 0,61 |
| $V_8$ | 0,127 | 0,30 |
| $V_9$ | 0,150 | 0,35 |
| $V_{10}$ | 0,156 | 0,37 |
| $V_{11}$ | 0,185 | 0,44 |

Abb.11: Darstellung der Umwandlungsraten (ohne Medikamentenzusatz) in Beziehung zum Proteingehalt der jeweiligen Plazenta.

# IV. STATISTIK

## 4.1. Erläuterungen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe des gepaarten t - Tests.
Dabei wurden die für die einzelnen Konzentrationen ermittelten Umwandlungsraten mit den dazugehörigen Kontrollwerten verglichen.
Obwohl die Anzahl der Versuche für eine statistische Berechnung sehr gering ist und eine genaue Aussage über die Signifikanz der Werte nur eingeschränkt möglich ist, ergaben sich doch aufgrund der relativ konstanten Werte zum Teil recht deutliche Unterschiede zwischen den jeweiligen Umwandlungsraten, was vor allem in den höheren Konzentrationsbereichen zur Geltung kommt.

## 4.2. Tabellen

In den Tabellen sind folgende Werte aufgeführt:

Konz. = Medikamentenkonzentration in mol/l
$\bar{x}$ = Mittelwert der Meßwerte
$\bar{y}$ = Mittelwert der dazugehörigen Kontrollwerte
$\bar{d}$ = mittlere Differenz
n = Anzahl der Freiheitsgrade
$t_i$ = ermittelter t - Wert
$t_G$ = aus der Tabelle entnommener Grenzwert für t
s = signifikante Abweichung Meßwert - Kontrollwert

Als Signifikanzniveau wurde p = 0,01 gewählt.

Betamethason

| Konz. | $\bar{x}$ | $\bar{y}$ | $\bar{d}$ | n | $t_i$ | $t_G$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $10^{-3}$ | 24,02 | 58,67 | 34,65 | 9 | 12,4 | 2,82 | s |
| $10^{-4}$ | 44,66 | 62,53 | 17,87 | 8 | 6,07 | 2,9 | s |
| $10^{-5}$ | 50,58 | 58,67 | 8,09 | 9 | 4,1 | 2,82 | s |
| $10^{-6}$ | 57,67 | 62,53 | 4,85 | 8 | 2,84 | 2,9 | |
| $10^{-7}$ | 44,75 | 48,72 | 3,97 | 3 | 2,04 | 4,54 | |
| $10^{-8}$ | 78,60 | 77,10 | -1,5 | 0 | - | - | |
| $10^{-9}$ | 47,52 | 48,72 | 1,2 | 3 | 0,69 | 4,54 | |
| $10^{-10}$ | 83,60 | 77,10 | -6,5 | 0 | - | - | |

Tamoxifen

| Konz. | $\bar{x}$ | $\bar{y}$ | $\bar{d}$ | n | $t_i$ | $t_G$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $10^{-3}$ | 15,67 | 58,67 | 43,0 | 9 | 10,6 | 2,82 | s |
| $10^{-4}$ | 44,31 | 62,53 | 18,22 | 8 | 7,09 | 2,9 | s |
| $10^{-5}$ | 50,61 | 58,67 | 8,06 | 9 | 3,73 | 2,82 | s |
| $10^{-6}$ | 59,62 | 62,53 | 2,91 | 8 | 1,71 | 2,9 | |
| $10^{-7}$ | 46,37 | 48,72 | 2,35 | 3 | 2,84 | 4,54 | |
| $10^{-8}$ | 82,50 | 77,10 | -5,4 | 0 | - | - | |
| $10^{-9}$ | 48,87 | 48,72 | -0,15 | 3 | 0,12 | 4,54 | |
| $10^{-10}$ | 75,20 | 77,10 | 1,9 | 0 | - | - | |

4.3. Ergebnisse der statistischen Auswertung

Betamethason

Bei Konzentrationen von $10^{-3}$, $10^{-4}$ und $10^{-5}$ mol/l wurde bei Zugrundelegen eines Signifikanzniveaus von p = 0,01 eine signifikante Erniedrigung der Umwandlungsraten gegenüber den Kontrollwerten beobachtet. Die Konzentrationen von $10^{-6}$ bis $10^{-10}$ mol/l lagen im Kontrollbereich, wobei über die Konzentrationen von $10^{-8}$ und $10^{-10}$ mol/l keine statistischa Aussage gemacht werden kann, da jeweils nur ein Meßwert vorliegt.

Signifikante Erniedrigung der Umwandlungsraten gegenüber den Kontrollwerten in % :
$10^{-3}$ mol/l : - 34,65 %
$10^{-4}$ mol/l : - 17,87 %
$10^{-5}$ mol/l : - 8,09 %

Tamoxifen

Auch hier wurde bei Konzentrationen von $10^{-3}$, $10^{-4}$ und $10^{-5}$ mol/l eine signifikante Erniedrigung der Umwandlungsraten gegenüber den Kontrollwerten beobachtet. Die Konzentrationen von $10^{-6}$ bis $10^{-10}$ mol/l lagen ebenfalls im Kontrollbereich, wobei wie oben die Konzentrationen von $10^{-8}$ und $10^{-10}$ mol/l von einer statistischen Aussage ausgeschlossen sind, da jeweils nur ein Meßwert vorliegt.

Signifikante Erniedrigung der Umwandlungsraten gegenüber den Kontrollwerten in % :
$10^{-3}$ mol/l : - 43,00 %
$10^{-4}$ mol/l : - 18,22 %
$10^{-5}$ mol/l : - 8,06 %

## V. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, unter Verwendung der Doppelisotopenmethode nach Schindler (115) und Siiteri (126, 127) die Beeinflußbarkeit des 3ß-ol-Dehydrogenase-$\Delta^5$-$\Delta^4$-Isomerase-Enzymsystems in der menschlichen Plazenta durch Betamethason bzw. Tamoxifen zu untersuchen; dabei wurde mit Konzentrationen gearbeitet, die ungefähr dem therapeutischen Bereich entsprechen.

Es wurde eine Inkubationszeit von 15 min. gewählt, die in vergleichbaren Untersuchungen von Depp (24), Ryan (108), Weimer (143), Hohlstein (56) und Bader (6) als am günstigsten ermittelt worden war; dabei ergab sich bei den Kontrollwerten eine durchschnittliche Umwandlungsrate von 60,3 %. In zwei Versuchen fiel bei gleicher Inkubationszeit eine Umwandlungsrate von rund 90 % auf, was jedoch auch in Untersuchungen von Ryan (108), Gabbe (36) und Pion (103) beschrieben wurde.
Eine Korrelation im Sinne Hagemenas (45), der in Plazenten weiblicher Feten eine gesteigerte Progesteronsynthese gegenüber denen männlicher Feten fand, kann in diesen Fällen nicht festgestellt werden; auch zeigte sich keine Abhängigkeit der Umwandlungsraten vom Proteingehalt der Plazenta.
Bei der Untersuchung des Stoffwechselschrittes Pregnenolon → Progesteron müssen auch mögliche weitere Metabolisierungswege in Betracht gezogen werden, die jedoch nach den bisher vorliegenden Ergebnissen kaum eine Rolle spielen dürften.
Sobrevilla (129) fand in Homogenaten geburtsreifer Plazenten keine Verstoffwechselung von Pregnenolon über eine Seitenkettenabspaltung in $C_{19}$- oder $C_{18}$-Steroide; die Rückumwandlung von Progesteron in Pregnenolon ist minimal (Lommer, 81; Röhner, 106; Weimer, 143) und vermutlich ebenso an die Gegenwart bestimmter Cofaktoren gebunden wie die in geringem Umfang stattfindende weitere

Umwandlung von Progesteron in 20α-OH-Progesteron (Rosner, 107; Gabbe,36; Lauritzen,73; Zander,151; Schuhmacher,119; Little,80).
Nach Gabbe (36), Ryan (108) und Pearlman (102) kann durch Zugabe von Cofaktoren, z.B. NAD, NADP, DPN, Glukose-6-phosphat, eine Stimulierung der 3β-ol-DHG-$\Delta^5$-Isomerase-Aktivität erreicht werden, Koritz (68) dagegen fand eine teilweise Hemmung durch Cofaktoren.
Um ein möglichst unverfälschtes Bild über den Einfluß der Medikamente auf die Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit auf einen Zusatz von Cofaktoren verzichtet.

Die Beeinflußung des 3β-ol-DHG-$\Delta^5$-$\Delta^4$-Isomerase-Systems durch Stoffwechselprodukte und Medikamente war Gegenstand mehrerer Untersuchungen: Depp (24) wies eine Hemmung durch Cyanoketon, Östradiol und Oxymethalon nach. Über die Wirkung von Serotonin (29,119), Melatonin (29) und Vasopressin (35) liegen ebenfalls Ergebnisse vor.
In Untersuchungen mit Phenobarbital wies Gupta (43) auf eine mögliche selektive Hemmung nur der 3β-ol-DHG hin.
Mit der vorliegenden Arbeit vergleichbare Studien wurden bis jetzt mit Ampicillin (6), Th 1165a (6,106), Palmitinsäure (6), Cb 154 (6,109), Spironolacton (56), Aminoglutethimid (56), Allylöstrenol (143), Cyproteronacetat (143), Rifampicin (136), Clomiphen (106) und Indometacin (109) durchgeführt. Dabei ergaben sich beispielsweise für Cyproteronacetat eine signifikante Hemmung der 3β-ol-DHG im Bereich von $10^{-5}$ mol/l und höher sowie eine maximale Stimulation im Bereich von $10^{-8}$ mol/l, für Spironolacton eine signifikante Hemmung im Bereich von $10^{-5}$ mol/l und höher, für Cb 154 eine signifikante Hemmung im Bereich von $10^{-4}$ mol/l und höher, für Clomiphen eine maximale Stimulation im Bereich von $10^{-5}$ mol/l, für Rifampicin eine maximale Stimulation im Bereich von $10^{-6}$ mol/l, für Allylöstrenol und für Th 1165a eine maximale Stimulation im Bereich von $10^{-8}$mol/l. In hohen Konzentrationen (bis

$10^{-3}$ mol/l) führten alle Medikamente zu einer signifikanten Erniedrigung der Progesteronsyntheserate.

Nach Untersuchungen von Wiener und Allen (144) muß eine Substanz, die spezifisch hemmend auf das 3ß-ol-DHG-$\Delta^5$-$\Delta^4$-Isomerase-System einwirken soll, eine ganz bestimmte Konfiguration aufweisen, und zwar ein Steroidgerüst mit einer oxygenen Komponente an $C_{20}$ und einer $\Delta^4$-3-Ketofunktion. Diese Voraussetzung erfüllen beispielsweise Progesteron und 20α-OH-Progesteron, die im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus auf die Progesteronsynthese einwirken. Bestätigt wird dies durch die Ergebnisse von Shinada et al. (124), die in in-vitro-Versuchen an menschlichen Gelbkörperextrakten eine Hemmung des 3ß-ol-DHG-$\Delta^5$-$\Delta^4$-Isomerase-Systems durch verschiedene Gestagenderivate nachwiesen. Als stärkster Hemmstoff stellte sich hierbei Norethisteron mit einer Reduktion der Umwandlungsrate auf 33% des Ausgangswertes dar, gefolgt von Progesteron, Chlormadinonacetat, Medroxyprogesteronacetat, Dydrogesteron, 17-OH-Progesteron und Allylöstrenol, das mit einer Reduktion der Umwandlungsrate auf 74% des Ausgangswertes auch noch eine deutliche Hemmung aufwies. Nach Shinada scheint der Wirkungsmechanismus nichtkompetitiver Art zu sein und im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus zu funktionieren.
Saure et al. (112) berichten in ähnlichen Untersuchungen an menschlichen Plazentaextrakten von Methylöstrenolon und Norethisteron als den wirksamsten Hemmstoffen der Progesteronsynthese. Dydrogesteron, Allylöstrenol, Lynöstrenol und Norethynodrel dagegen bewirkten unter den Versuchsbedingungen keine Hemmung, was die Vermutung nahelegt, daß sie unter bestimmten Voraussetzungen sogar eine Stimulation der Progesteronsynthese bewirken könnten.

Nach in-vivo-Untersuchungen von Johansson (59) ist HCG in der Lage, dem Hemmeffekt einiger Gestagene auf die Progesteronsynthese im Corpus luteum entgegenzuwirken; mögli-

cherweise wird es während der Inkubation in den Plazentahomogenaten synthetisiert. In vitro jedoch hat die Zugabe von HCG keinen Effekt auf die Bildung von Progesteron aus Cholesterol und Pregnenolon im Plazentagewebe (Saure,111).

Von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Medikamenten zeigt Betamethason die für eine spezifische Hemmwirkung geforderte Konfiguration. Dementsprechend fand sich in Konzentrationen von $10^{-5}$, $10^{-4}$ und $10^{-3}$ mol/l erwartungsgemäß eine signifikante Erniedrigung der Umwandlungsraten um 8 - 35 %. Dieser Effekt kann aufgrund der Molekülstruktur von Betamethason als nichtkompetitive Hemmwirkung bezeichnet werden.
In niedrigeren Konzentrationen ($10^{-6}$ - $10^{-10}$ mol/l) traten dagegen keine signifikanten Veränderungen der Umwandlungsraten mehr auf.
Leyendecker et al. (76) konnten bei Anwendung therapeutischer Dosen von Betamethason bei Schwangeren im letzten Trimenon keine Veränderungen der Serumkonzentrationen von Progesteron feststellen; Ohrlander et al. (99) kamen in vergleichbaren Untersuchungen zu ähnlichen Ergebnissen; auch hier übte Betamethason in therapeutischer Dosierung keinen nennenswerten Einfluß auf den Progesteronspiegel aus.

Bei Tamoxifen ergab sich in Konzentrationen von $10^{-5}$, $10^{-4}$ und $10^{-3}$ mol/l eine signifikante Erniedrigung der Umwandlungsrate von Pregnenolon zu Progesteron um 8 - 43 %; in niedrigeren Konzentrationen war keine signifikante Hemmung mehr feststellbar.
Da Tamoxifen nicht die von Wiener und Allen (144) geforderte Steroidstruktur aufweist, ist in diesem Fall nicht ohne weiteres eine Hemmwirkung zu erwarten. Aufgrund der antiöstrogenen Wirkung durch Besetzen der Östrogenrezeptoren und der Untersuchungen von Heuson (55), McGuire (90) und Allegra (3), die auch das Vorhandensein von Glucocorticoid- und Progesteron-Rezeptoren postulierten,

wäre es jedoch denkbar, daß Tamoxifen eine hemmende Wirkung auf die Umwandlung von Pregnenolon zu Progesteron durch Besetzung von Gestagen-Rezeptoren ausübt; der genaue Wirkungsmechanismus bedarf jedoch noch weiterer Abklärung.
Groom und Griffiths (42) beschrieben in ihren Untersuchungen an gesunden Frauen keine nennenswerte Änderung des Progesteronspiegels unter Tamoxifenbehandlung; dagegen trat in Untersuchungen von Senior (121) an infertilen Patientinnen ein geringer Anstieg des Progesteronspiegels auf.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Stimulation der Progesteronsynthese durch Betamethason oder Tamoxifen in keiner der angewandten Konzentrationen, auch nicht in den niedrigen Konzentrationsbereichen, festgestellt werden.

Da die Beeinflußung des 3ß-ol-DHG-$\Delta^5$-$\Delta^4$-Isomerase-Systems durch Pharmaka bereits in mehreren Arbeiten untersucht wurde (6,56,106,109,136,143), ist es interessant, die Wirkungen der einzelnen Medikamente miteinander zu vergleichen. Dabei fällt auf, daß in hohen Konzentrationen ($10^{-3}$ mol/l und höher) bei fast allen Medikamenten eine Hemmung feststellbar war; man kann deshalb davon ausgehen, daß in diesen Konzentrationsbereichen allein schon durch die Zahl der vorhandenen Moleküle eine hemmende Wirkung hervorgerufen wird. Ein Unterschied in der Wirkung zwischen den einzelnen Medikamenten kommt am deutlichsten im Bereich zwischen $10^{-4}$ und $10^{-8}$ mol/l zutage, was wohl auf den jeweiligen Wirkungsmechanismus und die Molekülstruktur zurückzuführen sein dürfte. In sehr niedrigen Konzentrationen ($10^{-9}$ - $10^{-10}$ mol/l) ist bei fast keinem Medikament mehr eine Wirkung zu verzeichnen. Wahrscheinlich ist hierbei die vorliegende Wirkstoffmenge zu gering, um noch quantitativ erfassbare Veränderungen der Umwandlungsraten hervorrufen zu können.

Abschließend muß jedoch festgehalten werden, daß Ergebnisse von in-vitro-Experimenten mit Vorbehalt zu bewerten sind: der natürliche Zellverband wird gesprengt, die Zellen selbst und ihre Elemente werden ganz oder teilweise zerstört, die komplexen Stoffwechselsteuerungsvorgänge können nicht mehr ablaufen (Schindler, 113). In-vitro-Verhältnisse können deshalb stark von denjenigen in vivo abweichen.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Mit der Doppelisotopenmethode wurde an menschlichem Plazentagewebe in vitro der Einfluß von Betamethason (Celestan$^{R}$) und Tamoxifen (Novaldex$^{R}$) auf die Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron (3ß-ol-Dehydrogenase-$\Delta^5$-$\Delta^4$-Isomerase-System) untersucht. Es wurden insgesamt 11 Versuche durchgeführt, wobei die Medikamente in unterschiedlichen Konzentrationen angewendet wurden: sowohl bei Betamethason als auch bei Tamoxifen lagen die untersuchten Konzentrationen zwischen $10^{-3}$ und $10^{-10}$ mol/l.
Das Plazentagewebe wurde zunächst homogenisiert und zentrifugiert; nach 15minütiger Inkubation wurden die radioaktiv markierten Steroide mit Essigsäureäthylester extrahiert und anschließend durch verschiedene Dünnschichtchromatographiesysteme, Acetylierung und Kristallisationen identifiziert und gereinigt; die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationsspektrometers.
Zusätzlich dazu wurde eine Proteinbestimmung jeder Plazenta durchgeführt, um eine eventuell bestehende Relation zwischen den Umwandlungsraten und dem Enzymgehalt der jeweiligen Plazenta nachzuweisen.

Die Untersuchungen erbrachten folgende Ergebnisse:

1. Betamethason führte in Konzentrationen von $10^{-3}$, $10^{-4}$ und $10^{-5}$ mol/l zu einer signifikanten Erniedrigung der Umwandlungsraten.
2. Bei Tamoxifen wurde ebenfalls eine signifikante Hemmung im Bereich zwischen $10^{-3}$ und $10^{-5}$ mol/l gefunden.
3. In Konzentrationen zwischen $10^{-6}$ und $10^{-10}$ mol/l lagen die Werte sowohl bei Betamethason als auch bei Tamoxifen im Kontrollbereich.
4. Eine signifikante Stimulation der Umwandlungsrate konnte auch in niedrigen Konzentrationen weder für Betamethason noch für Tamoxifen festgestellt werden.

5. Ohne Zugabe von Medikamenten betrug die Umwandlungsrate bei einer Inkubationsdauer von 15 min. durchschnittlich 60,3 %.
6. Eine Beziehung zwischen den Umwandlungsraten und dem Proteingehalt der jeweiligen Plazenta konnte nicht nachgewiesen werden.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS


1 ABRAMS, M.E.: Isolation and estimation of pulmonary surface active lipoprotein.
J.Appl.Physiol. 21, 718 (1966)

2 ADAMS, F.H. et al.: Surface properties and lipids from lungs of infants with hyaline membrane disease.
Pediatrics 66, 357 (1965)

3 ALLEGRA, J.C. et al.: Steroid hormone receptors in human breast cancer.
Proc.Amer.Ass.Cancer Res. 19, 118 (1978)

4 AXELROD, L.R., GOLDZIEHER, J.W.: Metabolism of (4-$^{14}$C)-progesterone by components of normal human ovaries.
Acta Endocrinol. 65, 707 - 711 (1970)

5 BADEN, M. et al.: A controlled trial of hydrocortisone therapy in infants with respiratory distress syndrome.
Pediatrics 50 (4), 526 - 534 (1972)

6 BADER, H.-J.: Über den Einfluß von Ampicillin, Th 1165a, Th1165a und Palmitinsäure, Palmitinsäure und C8 154 auf den Stoffwechsel von Pregnenolon und Progesteron in der menschlichen Plazenta.
Inauguraldissertation Tübingen 1977

7 BAILLIE, A.H., CAMERON, E.H.D., GRIFFITHS, K., HART, D.M.: 3ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase in the adrenal gland and placenta.
Journal of Endocrinology 31, 227 - 233 (1965)

8 BAIRD, D.T., COCKBURN, F., GALBRAITH, A., KELLY, R., LIVINGSTONE, J.R.B.: Formation of progesterone and pregnenolone from 4-$^{14}$C-cholesterol by the intact midterm human foeto-placental unit perfused in vitro.
Journal of Endocrinol. 56, 187 - 202 (1973)

9 BALLARD, P.L. et al.: Glucocorticoid levels in maternal and infant serum following antenatal betamethasone therapy.
Clin.Res. 23, 157 A (1975)

10 BAUM, M.: Comparison of 'Nolvadex' and cytotoxic agents. The Anti-oestrogen and Breast Cancer. Symposium King's College Cambridge. (1977)

11 BETINS, J.Z. et al.: The transplacental passage of prednisone and prednisolone in pregnancy near term.
J.Pediatr. 81, 936 (1972)

12 BIRD, C.E., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E., SOLOMON, S.: Metabolism of progesterone by the perfused previable human fetus.
J.Clin.Endocr.Metabol. 26, 1144 - 1154 (1966)

13 BLOCH, K.: The biological conversion of cholesterol to pregnandiol.
J.Biol.Chem. 157, 661 (1945)

14 BLOCK, M.F. et al.: Antenatal Glucocorticoid Therapy for the Respiratory Distress Syndrome in the Premature Infant.
Obstetrics and Gynecology 50 (2), 186 - 190 (1977)

15 BOSCH, F.X., JOSE, M.C., MUNOZ, A.B., OJEDA, B., VILADIU, P.: Combination of tamoxifen and adriamycin in the treatment of advanced breast cancer.
Oncology 80, 111 (1977)

16 CARDINALY, D.P., ROSNER, J.M.: Effects of melatonin, serotonin, N-acetyl-serotonin on the production of steroids by duck testicular homogenates.
Steroids 18, 25 - 37 (1971)

17 COLE, M.P., JONES, C.T.A., TODD, J.D.H.: A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer - an early clinical appraisal of ICI 46.474.
Brit.J.Cancer 25, 270 (1971)

18 COLE, M.P., JONES, C.T.A., TODD, J.D.H.: The treatment of advanced carcinoma of the breast with the antioestrogenic agent tamoxifen (ICI 46.474) - a series of 96 patients.
Adv.Antimicr.Antineopl.Chem. 2, 529 (1972)

19 COLE, M.P., TODD, J.D.H.: Tamoxifen (ICI 46.474) - clinical experience in 129 patients with advanced breast cancer.
Inserm. 55, 245 (1975)

20 CONRAD, S.H., PION, R.J., KITCHIN, J.D.: Pregnenolone sulfate in human pregnancy plasma.
J.Clin.Endocr. 27, 114 -117 (1967)

21 COWAN, R.A., GILES, C.A., GRANT, J.K.: The intramitochondrial distribution of the 3ß-Hydroxy-steroid-Dehydrogenase-Oxosteroid-Isomerase.
A probable Redistribution Artefact.
Journal of Steroid Bioch. 5, 607 - 608 (1974)

22 DE LEMOS, R.A. et al.: Acceleration of appearance of pulmonary surfactant in the fetal lamb by administration of corticosteroids.
Am.Rev.Resp.Dis. 102, 459 - 461 (1970)

23 DELL ACQUA, S., MANUSCO, S., BENAGIANO, G., VIQVIST, N., DICZFALUSY, E.: Androgen metabolism in the feto-placental unit at midterm.
2nd Int.Congr. on Hormonal Steroids (Excerpta Medica Foundation) (1967)

24 DEPP, R., COX, D.W., PION, R.J., CONRAD, S.H., HEINRICHS, W.J.: Inhibition of the pregnenolone 3ß-hydroxysteroid-dehydrogenase-isomerase systems of human placenta and corpus luteum of pregnancy.
Gynec.Invest. 4, 106 - 120 (1973)

25 DICZFALUSY, E.: Endocrine function of the human placenta.
Acta Endocr. 34, Suppl.50, 129 - 134 (1960)

26 DICZFALUSY, E.: Endocrine functions of the human foetoplacental unit.
Fed.Proc. 23, 791 - 798 (1964)

27 DICZFALUSY, E.: Steroid metabolism in the human foetoplacental unit.
Acta Endocr. 61, 649 - 664 (1969)

28 DICZFALUSY, E.: A modified theory of the steroid synthesis in the human foeto-placental unit.
Symp.Dtsch.Ges.Endokr. 16, 32 - 46 (1970)

29 ELLIS, L.C.: Inhibition of rats testicular androgen synthesis in vitro by melatonin and serotonin.
Endocrinology 90, 17 - 28 (1972)

30 FARRELL, P.M. et al.: Corticosteroids as primary therapeutic agents in respiratory distress syndrome.
Pediatrics 51 (5), 952 - 954 (1973)

31 FENWICK, L., JONES, R.L., NAYLOR, B., POYSER, N.L., WILSON, N.H.: Production of prostaglandins by the pseudopregnant rat uterus in vitro and the effect of tamoxifen with the identification of 6-keto-prostaglandin F as a major product.
Brit.J.of Pharmacology 59, 191 (1977)

32 FERRAZZI, E., CARTEI, G., MATTARAZZO, R., FIORENTINO, M.: Oestrogen-like effect of tamoxifen on vaginal epithelium.
Brit.Med.J. 1, 1351 (1977)

33 FROMSON, J.M., PEARSON, S., BRAMAH, S.: The metabolism of tamoxifen (ICI 46.474). Part II: In female patients.
Xenobiotika 3, 711 (1973)

34 FROMSON, J.M., SHARP, D.S.: The selective uptake of tamoxifen by human uterine tissue.
J.of Obstet.and Gynec.of the Brit.Com. 81, 321 (1974)

35 FYLLING, P.: Vasopressin-induced increase in peripheral plasma progesterone levels during early human pregnancy.
Acta Endocr. 66, 273 - 282 (1971)

36 GABBE, S.G., VILLEE, C.A.: Metabolism of pregnenolone by immature and term placental villi in organ culture.
Amer.J.of Obstet.and Gynec. 110, 543 - 546 (1971)

37 GENNSER, G.: Nebenwirkungen der pränatalen Kortikosteroidtherapie.
Perinatale Medizin, Bd.VII. 8.Dt.Kongress für Perinatale Medizin, Berlin 1977.
Thieme Verlag Stuttgart (1978)

38 GLICK, J., CREECH, F., HOLROYDE, C., KARPF, M., TORRI, S., VARANO, M.: Tamoxifen plus CMF for metastatic breast cancer.
Proc.Amer.Ass.Cancer Res. 19, 191 (1978)

39 GLUCK, L., LANDOWNE, R.A., KULOVICH, M.V.: Biochemical development of surface activity in mammalian lung. III.Structure changes in lung lecithin during development of the rabbit fetus and newborn.
Ped.Research 4, 352 (1970)

40 GOLDER, M.P., PHILLIPS, M.E.A., FAHMY, D.R., PREECE, P.H., JONES, V., HENK, J.M., GRIFFITHS, K.: Plasma hormones in patients with advanced breast cancer treated with tamoxifen.
Europ.J.of Cancer 12, 719 (1976)

41 GREAVES, M., ATKINS, D., IBBOTSON, K., MARTIN, T.J.: Breast tumors, bone resorption and prostaglandins.
Clin.Science and Molecular Medicine 54, 20 (1978)

42 GROOM, G.V., GRIFFITHS, K.: Effect of the anti-oestrogen tamoxifen on plasma levels of luteinising hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, oestradiol and progesterone in normal premenopausal women.
J.of Endocr. 70, 421 - 428 (1976)

43 GUPTA, C., KARAVOLAS, H.J.: lowered ovarian conversion of $^{14}$C-pregnenolone to progesterone and other metabolites during Phenobarbital (PB). Block of PMS-induced ovulation in immature rats. Inhibition of 3ß-hydroxysteroid-dehydrogenation.
Endocrinology 92, 117 - 124 (1973)

44 GUTERMAN, H.S.: Progesterone metabolism in the human female. Its significance in release to reproduction.
Recent Progr.Horm.Res., Vol.VIII, 293 - 331 (1953)

45 HAGEMENAS, F.C., KITTINGER, G.W.: The effect of fetal sex on placental biosynthesis of progesterone.
Endocrinology 94, 922 - 924 (1974)

46 HARBERT, G.M., MC GANGHEY, H.S., SCOGGIN, W.A., THORTON, W.N.: Concentration of progesterone in newborn and maternal circulations at delivery.
J.Obstet.Gynec. 24, 413 - 426 (1964)

47 HARPER, M.J.K., WALPOLE, A.L.: Contrasting endocrine activities of cis and trans isomers in a series of substituted triphenylethylenes.
Nature 87, 212 (1966)

48 HARPER, M.J.K., WALPOLE, A.L.: A new derivate of triphenylethylene: effect on implantation and mode of actions in rats.
J.Reprod.Fertil. 13, 101 (1967)

49 HARPER, M.J.K., WALPOLE, A.L.: Mode of action of ICI 46.474 in preventing implantation in rats.
J.Endocr. 37, 83 (1967)

50 HATASA, K., NAHAMURA, K.: electron microscopic observations of lung alveolar epithelial cells of normal young mice, with special reference to formation and secretion of osmiophilic lamellar bodies.
Z.Zellforschung 68, 266 (1965)

51 HECHTER, O., ZAFFARONI, A., JACOBSEN, R.P., LEVY, H., JEANLOZ, R.W., SCHENKER, V., PINCUS, G.: The nature and the biogenesis of the adrenal secretory product.
Rec.Progr. in Horm.Res. 6, 215 -246 (1951)

52 HEEL, R.C., BROGDEN, R.N., SPEIGHT, T.M., AVERY, G.S.: Tamoxifen: A review of its pharmacological properties and therapeutic use in the treatment of breast cancer.
Drugs 16, 1 - 24 (1978)

53 HELLIG, H., GATTEREAU, D., LEFEBVRE, Y., BOLTE, E.: Steroid production from plasma cholesterol I. Conversion of plasma cholesterol to placental progesterone in humans.
J.Clin.Endocr.Metabol. 30, 624 - 631 (1970)

54 HENNINGSEN, B., AMBERGER, H.: Antiöstrogene Therapie des metastasierenden Mammakarzinoms.
Dtsch.Med.Wschr. 102, 713 (1977)

55 HEUSON, J.C.: Current overview of EORTC clinical trials with tamoxifen.
Cancer Treatm.Rep. 60, 1463 (1976)

56 HOHLSTEIN, U.: Über den Einfluß von Spironolacton und Aminoglutethimid auf den Stoffwechsel von Pregnenolon zu Progesteron in der menschlichen Plazenta.
Inauguraldissertation Tübingen 1977

57 JACOBSEN, B.D.: Use of progestins in patients with arborization of cervical mucus smears.
Fertil.Steril. 16, 604 - 612 (1965)

58 JAFFE, R.B.: Biogenesis and metabolism of progesterone in the human fetus and placenta.
Clin.Obstet.Gynec. 10, 47 - 59 (1967)

59 JOHANSSON, E.D.B.: Depression of the progesterone levels in women treated with synthetic gestagens after ovulation.
Acta Endocr., Copenh. 68, 779 - 792 (1971)

60 JORDAN, V.C., KOERNER, S., ROBINSON, C.: Inhibition of oestrogen-stimulated prolactin release by anti-oestrogens.
J. of Endocr. 65, 151 (1975)

61 JORDAN, V.C., JASPAN, T.: Oestrogen binding as a predictive test for DMBA-induced tumour response to tamoxifen therapy.
Proc. of the 9th Int. Congr. of Chemotherapy (1976)

62 JORDAN, V.C.: Effects of tamoxifen in relation to breast cancer.
Brit.Med.J. 1, 1534 (1977)

63 JORDAN, V.C., COLLINS, M.M., ROWSBY, L., PRESTWICH, G.: A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity.
J.Endocr. 75, 305 - 316 (1977)

64 JORDAN, V.C.: Use of the DMBA-induced rat mammary carcinoma system for the evaluation of tamoxifen treatment as a potential adjuvant therapy.
The Anti-oestrogen and Breast Cancer.
Symp. King's College, Cambridge (1977)

65 JUNGI, F., WAGENKNECHT, L.: Tamoxifen alone or combined with multiple drug chemotherapy in disseminated breast carcinoma.
Proc.Amer.Ass.Cancer Res. 18, 181 (1977)

66 KIANG, D.T., KENNEDY, B.J.: Tamoxifen (antioestrogen) therapy in advanced breast cancer.
Annuals of Internal Medicine 87, 687 (1977)

67 KOIDE, S.S., TORRES, M.T.: Distribution of 3β-oldehydrogenase and $\Delta^5$-3-oxosteroid isomerase in homogenate fractions of human term placenta.
Biochem. et Biophys.Acta 105, 115 - 120 (1965)

68 KORITZ, S.B.: The conversion of pregnenolone to progesterone by small particles from rat adrenal.
Biochemistry 3, 1098 - 1102 (1964)

69 KOSEKI, Y., ZAVA, D.T., CHAMNESS, G.C., MC GUIRE, W.L.: Estrogen receptor translocation and replenishment by the antioestrogen tamoxifen.
Endocr. 101, 1104 (1977)

70 KOTAS, R.V., AVERY, M.E.: Accelerated appearance of pulmonary surfactant in the fetal rabbit.
J.Appl.Physiol. 30 (3), 358 - 361 (1971)

71 KURANO, A., KATAGIRI, H., NAHAMURA, M., NAHAMURA, G., SHIBATA, C., NAGATA, Y., KUSUDA, M.: Changes in blood hormone levels during treatment with tamoxifen, a new drug to induce ovulation.
Japanese Soc. of Fertility and Sterility (1976)

72 LABHSETWAR, A.P.: Role of oestrogen in ovulation: a study using the oestrogen antagonist ICI 46.474.
Endocrinology 87, 542 (1970)

73 LAURITZEN, CH., SCHAPER, H.: Ausscheidung von Progesteron sowie Progesteron-20α und -20β im Harn von Neugeborenen.
Symp. Dt. Ges. für Endocrinologie 70, 225-228 (1970)

74 LERNER, H.J., BAND, P.R., ISRAEL, L., LEUNG, B.S.: Phase II study of tamoxifen: Report of 74 patients with stage IV breast cancer.
Cancer Treatm.Rep. 60, 1431 (1976)

75 LEUSDEN VAN, H.A., THOMAS, C., TELEGDY, G., DICZFALUSY, E.: Lack of squalene on lanosterol biosynthesis by the perfused human placenta at term.
J. of Steroid Biochemistry 4, 349 - 354 (1973)

76 LEYENDECKER, G., KAULHAUSEN, H., MUND-HOYM, S., SCHANDER, K., NOCKE, W.: Der Einfluß von Betamethason auf die mütterlichen Serumkonzentrationen von Progesteron, 17-OH-Progesteron, Androstendion, Östradiol-17β, Östriol sowie Cortisol im letzten Schwangerschaftsdrittel.
Arch.Gynekol. 224 (1-4), 212 - 213 (1977)

77 LIGGINS, G.C. et al.: A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants.
Pediatrics 50, 515 - 525 (1972)

78 LINZEY, M.: Akutes Atemnotsyndrom: Mehr Luft für Frühgeborene.
Selecta 31, 2712 - 2715 (1978)

79 LIPPMAN, M.: Oestrogen-dependent human breast cancer in continous tissue culture.
Proc. of a Symp. on Hormonal Control of Breast Cancer, Alderly Park, Cheschire (1976)

80 LITTLE, B., DI MARTINIS, J., NYHOLM, B.: The conversion of progesterone to Δ-4-pregnene-20α-ol,3-one by human placenta in vitro.
Acta Endocr. 30, 530 - 538 (1959)

81 LOMMER, D., DORFMANN, R.J., FORCHIELLI, E.: Reversal of the 3β-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase reaction in rat adrenals.
Steroidologica 1, 175 - 182 (1970)

82 LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J.Biol.Chem. 193, 265 - 275 (1951)

83 LURIE, A.O., REID, D.E., VILLEE, C.A.: The role of the fetus and placenta in maintenance of plasma progesterone.
Amer.J.of Obstet.and Gynec. 96, 670 - 675 (1966)

84 MAJOR, J.S., GREEN, B., HEALD, P.J.: Interactions of oestradiol-17β and tamoxifen in the uterus of the pregnant rat.
J.of Endocrinology 71, 315 (1976)

85 MAMOLI, L.: Bakterielle Dehydrierung von Pregnenolon zu Progesteron.
Berichte d.Dt.Chem.Ges. 71, 2701 - 2703 (1938)

86 MATHUR, R.S., ARCHER, D.F., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E.: Quantitative assessment of the de novo sterol and steroid synthesis in the human foeto-placental unit.
Acta Endocr. 65, 663 - 674 (1970)

87 MATSUMOTO, K., YAMANE, G., ENDO, H., KOTOH, K., CHANO, K.: Conversion of pregnenolone to progesterone by rabbit placenta in vitro.
Acta Endocrin. 61, 577 - 584 (1969)

88 MC GUIRE, W.L., DE LAGARZA, M.: Similarity of the oestrogen receptor in human and rat mammary carcinoma.
J.Clin.Endocr. 36, 548 (1973)

89 MC GUIRE, W.L., CHAMNESS, G.C., COSTLOW, M.E., RICHERT, N.S.: Steroids and human breast cancer.
J.Steroid.Biochem. 6, 723 (1975)

90 MC GUIRE, W.L., HORWITZ, K.B., PEARSON, O.H., SEGALOFF, A.: Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer.
Cancer 39, 2934 (1977)

91 MILLER, G.L.: Protein determination for large numbers of samples.
Anal.Chem. 91, 664 (1959)

92 MORGAN, L.R., POSEY, L.E., KREMENTZ, E.T., HAWLEY, W., BEAZLEY, R.W.: Tamoxifen plus CMF for advanced breast cancer.
Proc.Amer.Ass.Cancer Res. 18, 166 (1977)

93 MOTOYAMA, E.K. et al.: Effect of cortisol on the maturation of fetal rabbit lungs.
Pediatrics 48 (4), 547 - 555 (1971)

94 MOURIDSEN, H., PALSHOF, T., PATTERSON, J., BATTERSBY, L.: Tamoxifen in advanced breast cancer.
Cancer Treatment Reviews 5, 131 - 141 (1978)

95 MUND-HOYM, S., NIESEN, M., SCHANDER, K.: Zur Prophylaxe des idiopathischen Atemnot-Syndroms.
Der Einfluß von Betamethason auf die Frequenz des idiopathischen Atemnot-Syndroms (RDS) im Frühgeborenen-Kollektiv der Univ.-Frauenklinik Bonn.
Fortschritte der Medizin 95 (8), 495 - 500 (1977)

96 NELSON, H.G.: Relationship between amniotic fluid lecithin concentration and respiratory distress syndrome.
Am.J.Obstet.Gynec. 112, 827 (1972)

97 NICHOLSON, R.J., GOLDER, M.P., DAVIES, P., GRIFFITHS, K.: Effects of oestradiol-17β and tamoxifen on total and accessible cytoplasmic oestradiol-17β receptors in DMBA-induced rat mammary tumors.
Europ.J.Cancer 12, 711 (1976)

98 NORDENSKJÖLD, B.: $^{3}$H-thymidine incorporation into DNA of mammary carcinoma before and after endocrine therapy.
Proc.of a Symp.on The Hormonal Control of Breast Cancer, Alderley Park, Cheshire (1976)

99 OHRLANDER, S., GENNSER, G., BATRA, S., LEBECH, P.: Effect of bethamethasone administration on estrone, estradiol-17β and progesterone in maternal plasma and amniotic fluid.
Obstet.Gynec. 49 (2), 148 - 153 (1977)

100 PALMER, R., ERIKSON, G., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E.: Studies on metabolism of $C_{21}$-steroids in the human foeto-placental unit. 2.Metabolism of pregnenolone sulfate by midterm placentas perfused in situ.
Acta Endocr. 52, 598 - 606 (1966)

101 PALMER, R., BLAIR, J.A., ERIKSON, G., DICZFALUSY, E.: Studies on metabolism of $C_{21}$-steroids in the human foeto-placental unit. 3.Metabolism of progesterone and 20α- and 20β-dihydro-progesterone by midterm placentas perfused in situ.
Acta Endocr. 53, 407 - 419 (1966)

102 PEARLMAN, W.H., CERCEO, E., THOMAS, M.: The conversion of $\Delta^5$-pregnen-3β-ol-21-one to progesterone by homogenates of human placental tissue.
J.Biol.Chem. 208, 231 - 239 (1954)

103 PION, R., JAFFE, R., ERIKSON, G., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E.: Studies on the metabolism of $C_{21}$-steroids in the foeto-placental unit.
Acta Endocr. 48, 243 - 248 (1965)

104 PRIESTMAN, T., BAUM, M., JONES, V., FORBES, J.: Comparative trial of endocrine versus cytotoxic treatment in advanced breast cancer.
Brit.Medical Journal 1, 1248 (1977)

105 RITCHIE, G.: The direct inhibition of prostaglandin synthetase of human breast cancer tumour tissue by 'Novaldex'. The Antioestrogen and Breast Cancer. Symp. King's College, Cambridge. (1977)

106 RÖHNER, H.: Über den Einfluß von Clomiphen und Th 1165a auf den Stoffwechselschritt von Pregnenolon zu Progesteron in der menschlichen Plazenta. Inauguraldissertation Tübingen 1977

107 ROSNER, J.M., HALL, P.F., EIK-NES, K.B.: Conversion of progesterone to pregnenolone by rabbit testes. Steroids 5, 199 - 210 (1965)

108 RYAN, K.J., MEIGS, R., PETRO, Z.: The formation of progesterone by the human placenta. Amer.J.Obstet.Gynec. 96, 676 - 682 (1966)

109 SACHER, S.: Über den Einfluß von Cb 154 und Indometacin auf das 3ß-ol-DHG-$\Delta^5$-$\Delta^4$-Isomerasesystem der menschlichen Plazenta. Inauguraldissertation Tübingen (1983)

110 SAMUELS, L.T., HELMREICH, M.L.: An enzyme in endocrine tissue which oxydizes $\Delta^5$-3ß-hydroxysteroids to $\alpha,\beta$ unsaturated ketones. Science 113, 490 (1951)

111 SAURE, A.: The biogenesis and metabolism of steroids in the human placenta of 9 - 14 weeks in vitro. Annls.Acad.Sci.Fenn.,Sect.V,Medica 159,1 -131 (1973)

112 SAURE, A., TERÄVÄINEN, T., KARJALAINEN, O.: The effect of synthetic gestagens on progesterone formation in vitro in human placenta of early pregnancy. J.Reprod.Fert. 51, 369 - 373 (1977)

113 SCHINDLER, A.E.: Die Funktion der fetalen Nebennierenrinde. Dtsch.Med.Wschr. 97, 1712 - 1716 (1972)

114 SCHINDLER, A.E.: Steroide im Fruchtwasser. Fortschritte der Geburtshilfe und Gynäkologie, Vol. 46, 1 - 89 (1972)

115 SCHINDLER, A.E., SIITERI, P.K.: Isolation and quantitation of steroids from normal human amniotic fluid. J. of Cli.Endocr. and Metab. 28, 1189 - 1198 (1968)

116 SCHINDLER, A.E., EBERT, A., FRIEDRICH, E.: Conversion of androstendione to estrone by human fat tissue. J.Clin.Endocr.Metabol. 35, 627 - 630 (1972)

117 SCHINDLER, A.E., BUCK, W., PFLÜGER, H., OTT, R., WINKLER, U., KÖNIG, P.A., FRIEDRICH, E.:Biochemical and histochemical studies on fetal tissues. Res. on Steroids 5, 145 - 156 (1973)

118 SCHINDLER, A.E., VLASSIS, G., TALIADOUROS, G., SFOUNTOURIS, B.: Influence of serotonin on the aromatization of androstendione by normal human placenta. Int.Res.Comm.Syst. (73-3) 3-5-5 (1973)

119 SCHUHMACHER, E.: Über den Einfluß von Serotonin auf den Stoffwechsel von Pregnenolon zu Progesteron in der menschlichen Plazenta. Inauguraldissertation Tübingen 1975

120 SEIFART, K.H., HANSEL, W.: Some characteristics and optimum incubation conditions of in vitro progesterone synthesis by bovine corpora lutea. Endocrinology 82, 232 - 240 (1968)

121 SENIOR, B.E., CAWOOD, M.L., OAKEY, R.E., MC KIDDIE, J.M., SIDDLE, D.R.: A comparison of the effects of clomiphene and tamoxifen treatment on the concentrations of oestradiol and progesterone in the peripheral plasma of infertile women. Clin.Endocrinology 8, 381 - 389 (1978)

122 SHARMA, S.C., PUGH, D.M.: The effect of tamoxifen on the in vitro production of prostaglandins F by the guinea pig uterine tissue. Europ.J. of Pharmacology 42, 91 (1977)

123 SHINADA, T.: The conversion of pregnenolone-7α-$^{3}H$ and progesterone-4-$^{14}C$ to estrogens by corpora lutea of menstrual cycles and pregnancy.
Endocrinol.Jap. 22, 151 (1975)

124 SHINADA, T., YOKOTA, Y., IGARASHI, M.: Inhibitory effect of various gestagens upon the pregnenolone 3β-ol-DHG-$\Delta^{5-4}$-isomerase system in human corpora lutea of menstrual cycles.
Fertility and Sterility 29 (1), 84 - 87 (1978)

125 SIEBERT, W., MEITINGER, C.: Prophylaxe des Atemnotsyndroms mit Betamethason.
Geburtsh. und Frauenheilk. 35, 130 - 133 (1975)

126 SIITERI, P.K.: The isolation of urinary estrogens and determination of their specific activities following the administration of radioactive precursors to humans.
Steroids 2, 762 - 772 (1963)

127 SIITERI, P.K., TIPPIT, P., YATES, C., PORTER, J.G.: A double isotope procedure for the determination of progestins in rat ovarian vein blood.
Endocrinology 82, 837 - 843 (1968)

128 SINGH, E., KRISHNA, B.: Metabolism of pregnenolone by the human placenta.
Amer.J.Obstet.Gynec. 104, 605 - 606 (1969)

129 SOBREVILLA, L., HAGERMAN, D., VILLEE, C.: The metabolism of pregnenolone and 17-hydroxyprogesterone by homogenates of human term placentas.
Biochem.Biophys.Acta 93, 665 - 667 (1964)

130 SOLOMON, S., BIRD, C.E., LING, W., IWAMIYA, M., YOUNG, P.C.M.: Formation and metabolism of steroids in the fetus and placenta.
Rec.Progr. in Horm.Res. 23, 297 - 335 (1967)

131 SOLOMON, S., FUCHS, F.: Progesterone and related neutral steroids.
In Fuchs,F., Klopper,A.: Endocrinology of pregnancy, Harper and Row, New York, Evanstone, London 66 - 100 (1971)

132 TAEUSCH, H.W. jr. et al.: Accelerated lung maturation and increased survival in premature rabbits treated with hydrocortisone.
Amer.Rev.Resp.Dis. 105, 971 - 973 (1972)

133 TAUSK, M.: Pharmakologie der Hormone.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2.Auflage (1973)

134 TAYLOR, T., COUTTS, J.R.T., MACNAUGHTON, M.C.: Oestrogen formation in human fetuses perfused with $^{14}$-C-progesterone.
Acta Endocr. 75, 595 - 600 (1974)

135 TELEGDY, G.: Quantitative assessment of the principal steroids formed by human placentas perfused with labelled cholesterol in vitro.
Acta Endocr. 72, 127 - 136 (1973)

136 TELLER, P.H.: Über den Einfluß von Rifampicin auf den Metabolismus von Pregnenolon zu Progesteron in der menschlichen Plazenta.
Inauguraldissertation Tübingen 1977

137 TELLER, W.M.: Besonderheiten des Steroidstoffwechsels beim menschlichen Fetus und Neugeborenen.
Symp.Dtsch.Ges.Endocr. 16, 95 - 107 (1970)

138 TORMEY, D.C., SIMON, R.M., LIPPMAN, M.E., BULL, J. M., MYERS, C.E.: Evaluation of tamoxifen dose in advanced breast cancer: A progress report.
Cancer Treatment Reports 60, 1451 (1976)

139 TOWNSEND, C., RYAN, K.J.: In vitro metabolism of pregnenolone-7α-$^{3}$H, progesterone-4-$^{14}$C and androstendione-4-$^{14}$C by rat tissue.
Endocr. Philadelphia 87, 151 - 155 (1970)

140 WALPOLE, A.L.: The anti-oestrogenic activity of 'Nolvadex' in laboratory animals.
Proc. of a Symp. on Hormonal Control of Breast Cancer, Alderley Park, Cheshire (1975)

141 WARD, H.W.C.: Anti-oestrogenic therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels.
Brit.Med.J. 1, 13 (1973)

142 WARD, H.W.C.: Clinical experience with anti-hormone therapy.
Proc. of a Symp. on The Hormonal Control of Breast Cancer, Alderley Park, Cheshire (1976)

143 WEIMER, A.: Über den Einfluß von Allylöstrenol und Cyproteron-Acetat auf das 3ß-ol-DHG-$\Delta^5$-$\Delta^4$-Isomerasesystem der menschlichen Plazenta.
Inauguraldissertation Tübingen 1977

144 WIENER, M., ALLEN, H.G.: Inhibition of placental steroid synthesis by steroid metabolites. II: Inhibitor specifity.
Steroids 12 (2), 261 - 273 (1968)

145 WIENER, M., FRIEDLAENDER, R.L.: Abnormal progesterone synthesis in placental tissue from a spontaneous abortion.
Amer.J.Obstet.Gynec. 111, 942 - 946 (1971)

146 WILLIAMS, O.H. et al.: The isolation and characterisation of the lamellar body of bovine lung.
Prep.Biochem. 1, 37 (1971)

147 WILLIS, J.K.: Investigations of hormone changes in breast cancer patients before and after treatment with Novaldex.
Proc. of a Symp. on Hormonal Control of Breast Cancer, Alderly Park, Cheshire (1975)

148 WILLIS, J.K., LONDON, D.R., WARD, H.W.C., BUTT, W. R., LYNCH, S.S., RUDD, B.T.: Recurrent breast cancer treated with the antioestrogen tamoxifen: correlation between hormonal changes and clinical course.
Brit.Med.Journal 1, 425 (1977)

149 YOUNGLAI, E.V., SOLOMON, S.: Neutral steroids in human pregnancy.
In: Klopper, A., Diczfalusy, E.: Fötus und Plazenta 249 - 298, Blackwell Scientific Publications (1969)

150 ZANDER, J.: Steroide im Plasma von menschlichem Plazentablut (Nabelschnurplasma).
Acta Endocr.(Kbh.) 41, 507 - 520 (1962)

151 ZANDER, J.: Die Hormonbildung der Plazenta und ihre Bedeutung für die Frucht.
Archiv f. Gynäk. 198, 113 - 127 (1963)

152 ZANDER, J., VON MÜNSTERMANN, A.: Weitere Untersuchungen über Progesteron in menschlichem Blut und Geweben.
Klin.Wochenschrift 32, 894 (1954)

153 ZANDER, J., VON MÜNSTERMANN, A.M.: Progesteron im menschlichen Blut und Gewebe. III.Progesteron in der Plazenta, in der Uterusschleimhaut und im Fruchtwasser.
Klin.Wochenschrift 34, 944 - 953 (1956)

DANK

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof.Dr.med. A.E. Schindler für die Stellung des Themas, die Bereitstellung von Arbeitsplatz, Material und Geräten und nicht zuletzt für seine stete Bereitschaft und Unterstützung bei der Lösung von theoretischen und technischen Problemen. Außerdem möchte ich Herrn Dr. M. Zwirner, Frau B. Lerch sowie den technischen Assistentinnen des Steroidlabors der Universitätsfrauenklinik Tübingen für die Beratung und Hilfestellung bei der praktischen Durchführung der Versuche und Herrn Prof. Dr. Dietz für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Versuche danken.

# LEBENSLAUF

Am 11.März 1955 wurde ich, Vera Gerhilde Gruber, als Tochter der Eheleute Karlheinz Gruber und Gerhilde, geb. Fristling, in Stuttgart-Bad Cannstatt geboren.
Nach Absolvierung der Grundschule trat ich 1966 in das Gymnasium Korntal ein, wo ich am 29.Mai 1974 das Abitur ablegte.
Im Wintersemester 1974/75 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität Hohenheim, von wo ich nach zwei Semestern zur Universität Tübingen überwechselte. Nach bestandenem Physikum nahm ich dort im Herbst 1976 das klinische Studium auf, das ich am 15.Oktober 1980 mit dem Bestehen der Ärztlichen Prüfung abschloß.
Im Frühjahr 1978 begann ich mit dem experimentellen Teil der vorliegenden Dissertation im Steroidlabor der Universitätsfrauenklinik in Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr.med. A.E. Schindler.